

Université de Montréal

**Métabolisme du glucose et du glycérol dans la cellule pancréatique β et les
hépatocytes et identification des voies de détoxification du glucose.**

par
Yves Mugabo

Département de nutrition
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en nutrition

Août 2016
©Yves Mugabo, 2016
Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Métabolisme du glucose et du glycérol dans la cellule pancréatique β et les hépatocytes et
identification des voies de détoxification du glucose**

présentée par :

Yves Mugabo

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Mathieu Ferron, président-rapporteur

Dr Marc Prentki, directeur de recherche

Dr Ashok Srivastava, membre du jury

Dr Siegfried Hekimi, examinateur externe

Dr Pierre Haddad, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Un apport excessif en nutriments calorigéniques et une diminution des niveaux d'activité physique contribuent à l'augmentation fulgurante de l'obésité et des maladies métaboliques associées telles le syndrome métabolique et le diabète de type 2 (DT2). L'insuline sécrétée par les cellules β de l'îlots de Langerhans, est une hormone clé dans la régulation énergétique de l'organisme. Le glucose plasmatique est le principal stimulateur de la sécrétion d'insuline via la production de facteurs de couplage métabolique (FCM), des molécules clés qui établissent des liens entre le métabolisme du glucose par la cellule β et l'exocytose de l'insuline. D'autres nutriments calorigéniques comme les acides gras et certains acides aminés amplifient la sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG), en partie via leur métabolisme intracellulaire. Néanmoins les mécanismes et FCM impliqués dans la SIIG restent en partie méconnus. Notre laboratoire a mis en évidence la contribution importante du cycle glycérolipides /acides gras libres (GL/FFA) dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose et son amplification par les acides gras. Le cycle GL/FFA est en effet au carrefour du métabolisme du glucose et des lipides et permet la production de molécules signalétiques lipidiques via les voies de la lipogénèse et lipolyse. Il joue un rôle important dans la régulation de la SIIG via la production de FCM tel le monoacylglycérol et dans la disponibilité intracellulaire des nutriments et de leurs dérivés. Des défauts de fonctionnement du cycle GL/FFA contribuent à la pathogenèse du DT2 en raison de son rôle dans la signalisation lipidique et dans la détoxification des nutriments calorigéniques. En effet, l'exposition chronique à des niveaux élevés de glucose et d'acides gras induit un dysfonctionnement et éventuellement l'apoptose des cellules β . Néanmoins les cellules β doivent continuellement capter le glucose pour promouvoir la sécrétion d'insuline. Afin de faire face à la toxicité cellulaire causée par un apport excessif de nutriments calorigéniques, les cellules utilisent des voies métaboliques de détoxification pour transformer les nutriments calorigéniques en molécules plus inertes et éventuellement les exporter dans le milieu extracellulaire. Les cellules, en général, possèdent des mécanismes pour éliminer les molécules « étrangères » comme les toxines, médicaments et autres xénobiotiques. En revanche les mécanismes impliqués dans la détoxification des nutriments en excès et de leurs dérivés sont dans l'ensemble méconnus quelles que soient les cellules.

Dans une première partie de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse de l'existence de voies métaboliques de détoxification des nutriments calorigéniques. Pour mettre en lumière ces voies, nous avons évalué la destination des carbones du glucose vers différents métabolites candidats. Plus précisément, un moyen d'identifier les voies de détoxification du glucose en excès est de mesurer les activités des voies métaboliques et les niveaux de métabolites à diverses concentrations de glucose et d'identifier ceux qui augmentent encore au-delà des concentrations maximales de glucose pour la SIIG. De plus, contrairement à la plupart des études portant sur la SIIG, nous avons utilisé un milieu d'incubation plus enrichi en nutriments avec un niveau basal de 4 mmol/l glucose supplémenté en glutamine (2 mmol/l) et en carnitine (50 μ mol/l) pour les îlots de Langerhans *ex vivo*. En effet, nous avons réalisé que dans les études effectuées habituellement avec un niveau basal de glucose de 2-3

mmol/l, les cellules β sont appauvries en énergie. Les résultats indiquent que les processus possibles de détoxification pourraient impliquer différentes formes de stockage d'énergie (TG, glycogène et les esters du cholestérol) et la libération extracellulaire de métabolites dérivés du glucose (glycérol, cholestérol et FFA). En outre, les données indiquent qu'une destination majeure des carbones du glucose est le glycérol relâché dans le milieu.

Dans une deuxième partie de cette thèse, nous avons cherché à savoir quelles sont les voies métaboliques et FCM candidats qui corrélerent le mieux avec la sécrétion d'insuline à diverses concentrations de glucose. Ceci a été effectué dans les ilots de Langerhans de rat et aussi en utilisant une approche de métabolomique ciblée dans les cellules INS 832/13. Plusieurs métabolites corrélerent bien avec la SIIG, en particulier certains intermédiaires du cycle Krebs, le malonyl-CoA et aussi la baisse des niveaux d'ADP. Prises dans leur ensemble, ces données mettent en lumière le rôle de différents mécanismes dans la signalisation métabolique des cellules β en réponse au glucose, tels que le métabolisme oxydatif mitochondrial, l'anaplérose et la voie malonyl-CoA/ molécules signalétiques lipidiques et suggèrent qu'une diminution des niveaux d'ADP joue un rôle important dans la sécrétion d'insuline.

Dans une troisième partie de la thèse, sachant que les niveaux de glycérol-3 phosphate (Gro3P) augmentent considérablement en réponse au glucose et que le glycérol est produit en grande quantité par la cellule β , nous avons cherché à déterminer sa provenance. Lors de notre première étude, nous avons obtenu des résultats indiquant que la production de glycérol provenait du cycle GL/FFA et aussi d'une source inconnue associée aux niveaux de glucose extracellulaire. Nous avons émis l'hypothèse qu'une enzyme inconnue chez les mammifères pourrait directement transformer le Gro3P en glycérol. En utilisant une approche d'analyse *in silico*, nous avons réalisé que la phosphoglycolate phosphatase (PGP) humaine et de souris partage des séquences significativement homologues avec des enzymes d'organismes inférieurs pouvant hydrolyser le Gro3P. Ainsi nous avons étudié dans le détail le rôle de l'enzyme PGP dans le métabolisme de la cellule β et des hépatocytes. Nous avons déterminé expérimentalement que PGP a une activité Gro3P phosphatase (G3PP) importante chez les mammifères pouvant hydrolyser le Gro3P en glycérol. Nous avons émis l'hypothèse que PGP agit en fait comme une G3PP et joue un rôle central dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides et de la signalisation, ainsi que dans la réponse au stress métabolique. En utilisant des techniques de biologie moléculaire et de biochimie, nous avons observé que PGP/G3PP, en contrôlant les niveaux intracellulaire de Gro3P issu de la glycolyse, régule cette dernière de même que de nombreuses voies métaboliques et fonctions des cellules β et hépatiques. Ainsi, PGP/G3PP contrôle aussi la synthèse de glycérolipides, l'oxydation des acides gras, l'état redox et le métabolisme énergétique mitochondrial dans la cellule β pancréatique et les hépatocytes, ainsi que la SIIG et la réponse au stress métabolique dans la cellule β , et la gluconéogenèse dans les hépatocytes.

En résumé, nous avons obtenu des évidences en faveur de voies métaboliques et FCM impliqués dans la SIIG et possiblement dans la gluco-détoxification des cellules β et déterminé quelles voies sont quantitativement

importantes et pourraient jouer un rôle en termes de détoxification des nutriments en excès. Les données indiquent que les cellules β convertissent une quantité importante de glucose en glycérol lequel est exporté par la cellule comme possible processus de gluco-détoxification et de modulations d'autres voies métaboliques. De plus, nous avons découvert une toute nouvelle voie métabolique dans les cellules β et les hépatocytes avec l'identification d'une G3PP capable de transformer directement le Gro3P en glycérol. L'identification d'une G3PP auparavant inconnue dans les cellules de mammifères est un ajout important à notre compréhension de la régulation du métabolisme intermédiaire en général, de la signalisation métabolique et de la détoxification du glucose en excès. Ainsi, la G3PP est une nouvelle cible thérapeutique intéressante pour les troubles liés aux maladies cardio-métaboliques telles le DT2 et l'obésité.

Mots clés: Métabolisme du glucose et des lipides, métabolisme mitochondriale, cellule β pancréatique, hépatocyte, sécrétion d'insuline, gluco-détoxification, glucolipotoxicité, glycérol-3-phosphate phosphatase, diabète de type 2, facteurs de couplages métabolique.

ABSTRACT

Excessive intake of calorogenic nutrients and low levels of physical activity contribute to the rapid increase in obesity and related metabolic diseases such as metabolic syndrome and type 2 diabetes (T2D). Insulin secreted by the β cells of the islets of Langerhans, is a key hormone in energy regulation of the organism. Plasma glucose is the main stimulator of insulin secretion via the production of metabolic coupling factors (MCF), which are key molecules mediating the link between glucose metabolism by β cell and the exocytosis of insulin. Other calorogenic nutrients such as fatty acids and certain amino acids amplify glucose-induced insulin secretion (GSIS), partly via their intracellular metabolism. Nevertheless, the contribution of MCFs in GSIS and the related mechanisms remain partly unknown. Our laboratory has highlighted the contribution of the glycerolipids/free fatty acids (GL/FFA) cycle in insulin secretion induced by glucose and amplified by fatty acids, and this cycle, which encompasses lipogenesis and lipolysis, plays an important role in the overall regulation of glucose and lipid metabolism. In addition, it takes part in regulating the GSIS via MCF production such as monoacylglycerol and in the intracellular availability of nutrients and their derivatives. Disturbed GL/FFA cycle contributes to the pathogenesis of T2D because of its role in lipid signaling and calorogenic nutrients detoxification. Indeed, chronic exposition to elevated glucose and FFA cause pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis as well. Nevertheless, β cells must continually take-up glucose for promoting insulin secretion. To cope with the cellular toxicity caused by excessive intake of calorogenic nutrients, cells use metabolic detoxification pathways to convert calorogenic nutrients into more inert molecules and eventually export them extracellularly. Cells have various mechanisms and strategies to eliminate "foreign" molecules such as toxins, drugs and other xenobiotics. However, the mechanisms involved in the detoxification of excess nutrients and their derivatives are mostly unknown whatever the cell type.

In the first part of the thesis, we hypothesized the existence of metabolic pathways for calorogenic nutrients detoxification. To highlight these pathways, we evaluated the destination of glucose carbon towards different metabolite candidates. More specifically, one way to identify pathways possibly involved in glucose excess detoxification is to measure metabolic pathway activities and metabolite levels at various concentrations of glucose, and identify those that increase further beyond the maximum glucose concentrations for GSIS. Furthermore, in contrast to most GSIS studies, we used a nutrient enriched incubation medium with a basal level of 4 mmol/l glucose supplemented with glutamine (2 mmol/l) and carnitine (50 μ mol/l) when using isolated Langerhans islets. In fact, we realized that the basal level of 2-3 mmol/l glucose alone used in most studies, results in cellular energy depletion. Overall results indicate that detoxification processes could involve different forms of energy storage (TG, glycogen and cholesterol esters) and the extracellular release of metabolites derived from glucose (glycerol, cholesterol and FFA). Furthermore, data indicate that a major fate of glucose carbons is their transformation and released into the medium in the form of glycerol.

In the second part of the thesis, we sought to identify metabolic pathways and MCF candidates that correlate best with insulin secretion at various concentrations of glucose. This was done in isolated rat Langerhans islets and also using a targeted metabolomic approach in INS 832/13 cells. Several metabolites correlate well with GSIS, particularly several Krebs cycle intermediates, malonyl-CoA and also a lowering in the levels of ADP. Taken together, these data highlight the role of different mechanisms in β -cell metabolic signaling in response to glucose, such as oxidative mitochondrial metabolism, anaplerosis, malonyl-CoA/lipid signaling, and suggest that a lowering in ADP levels may play an important role in GSIS.

In the third part of the thesis, given that glycerol 3-phosphate (Gro3P) and glycerol levels increase dramatically in response to glucose in β cells, we sought to determine the process at the source of this glycerol production. In the first study, results suggested that the glycerol production could originate from the GL/FFA cycle but also from an unknown source also associated with extracellular glucose levels. We hypothesized that an unknown enzyme in mammals could directly transform Gro3P into glycerol. Using an *in silico* analysis approach, we realized that human and mouse phosphoglycolate phosphatase (PGP) share significant amino acid sequence homologies with lower organism enzymes, which hydrolyze Gro3P into glycerol. Thus, we studied in detail the role of PGP in the metabolism of the β cell and hepatocytes. We have determined that PGP has an important Gro3P phosphatase (G3PP) activity in mammals that can hydrolyze Gro3P into glycerol. We hypothesized that PGP effectively acts as a G3PP and plays a central role in the regulation of glucose and lipid metabolism and signaling, as well as in response to metabolic stress. Using molecular biology and biochemistry approaches, we observed that PGP/G3PP, by controlling glycolysis-derived Gro3P intracellular levels, regulates glycolysis flux as well as many metabolic pathways and cellular functions in β cells and hepatocytes. PGP/G3PP also controls the synthesis of glycerolipids, fatty acids oxidation, redox state and mitochondrial energy metabolism in the pancreatic β cell and hepatocytes, the GSIS and the response to metabolic stress in the β cell, and gluconeogenesis in hepatocytes.

In summary, we have obtained evidences on the role of various metabolic pathways and MCF in β cell metabolic signaling of GSIS and gluco-detoxification processes. More specifically, we have shed light on metabolic pathways that may be quantitatively important and could play a key role in the detoxification of nutrient excess. The data indicate that β cells convert a significant amount of glucose into glycerol, which is exported out of the cell. This transformation of the glucose carbons acts probably as a gluco-detoxification process and also could serve to modulate metabolic pathways such as glycolysis. In addition, we discovered a new metabolic pathway in β cells and hepatocytes with the identification of a G3PP that is able to directly transform Gro3P into glycerol. The identification of a previously unknown G3PP in mammalian cells is an important addition to our understanding of the regulation of intermediary metabolism at large, metabolic signaling and glucose excess

detoxification. Thus, G3PP is an interesting new therapeutic targets for cardio-metabolic diseases-related disorders such as T2D and obesity.

Keywords: Glucose and lipid metabolism, mitochondrial metabolism, pancreatic β -cell, hepatocyte, insulin secretion, gluco-detoxification, glucolipotoxicity, glycerol-3-phosphate phosphatase, type 2 diabetes, metabolic coupling factors.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations.....	xvi
Dédicace.....	xxiii
Remerciements.....	xxiv
1. Introduction.....	25
1.1. Le diabète et l'homéostasie du glucose.....	26
1.1.1. Impact et croissance du diabète dans le monde.....	26
1.1.2. Les types de diabètes.....	27
1.1.3. Homéostasie du glucose.....	27
1.2. Pathogenèse du diabète de type 2.....	28
1.2.1. Étiologie générale du diabète de type 2.....	28
1.2.2. Histoire naturelle du diabète de type 2.....	28
1.2.3. Différentes formes du diabète de type 2 et génétique associée	31
1.2.4. Résistance à l'insuline (RI).....	34
1.2.4.1. Contributions de la RI des tissus spécifiques.....	34
1.2.4.2. Signes cliniques de la RI.....	36
1.2.4.3. Mesure physiologique de la RI.....	37
1.2.4.4. Conditions pathologiques associées à la RI.....	37

1.2.4.4.1.	Obésité.....	37
1.2.4.4.2.	Intolérance au glucose et les hormones incrélines.....	38
1.2.4.4.3.	Syndrome métabolique.....	40
1.2.4.5.	Mécanismes cellulaires et moléculaires de la RI.....	42
1.2.4.5.1.	Glucotoxicité.....	42
A)	Stress oxydatif.....	42
B)	Voie de biosynthèse des hexosamines.....	42
C)	AGEs.....	44
1.2.4.5.2.	Lipotoxicité.....	44
1.2.4.5.3.	Inflammation.....	45
1.2.5.	Dysfonction, défaillance et mort de la cellule β pancréatique.....	46
1.2.5.1.	Glucotoxicité.....	47
1.2.5.2.	Lipotoxicité.....	48
1.2.5.3.	Glucolipotoxicité.....	49
1.2.5.4.	Inflammation.....	50
1.2.5.5.	Stress du réticulum endoplasmique.....	51
1.2.5.6.	Dysfonction mitochondriale.....	52
1.3.	Métabolisme énergétique et diabète de type 2.....	53
1.3.1.	Métabolisme glucidique et lipidique dans le diabète de type 2.....	54
1.3.2.	Apport excessif de nutriments et diabète de type 2.....	54
1.3.3.	Anaplérose/cataplérose et cycles du pyruvate.....	55
1.3.4.	Le cycle glycérolipides/acides gras libres (GL/FFA).....	58
1.3.4.1.	Lipogenèse, lipolyse et enzymes associées.....	59

1.3.4.2.	Métabolites générés par le cycle GL/FFA.....	61
1.3.4.3.	Rôle du cycle GL/FFA dans le diabète de type 2.....	63
1.4.	Détoxification des nutriments en excès.....	64
1.4.1.	Généralités.....	64
1.4.2.	Le concept de glucolipodétoxification.....	65
1.4.3.	Le cycle GL/FFA et détoxification des nutriments calorigéniques.....	66
1.4.3.1.	Production et exportation du glycérol.....	67
1.4.3.2.	Exportation des FFA.....	68
1.4.3.3.	Cycle futile et AMP-Kinase.....	69
1.5.	Sécrétion d'insuline.....	69
1.5.1.	Biosynthèse, transport intracellulaire et exocytose de l'insuline.....	70
1.5.2.	Sécrétion d'insuline induite par les nutriments.....	70
1.5.2.1.	Caractéristiques des cellules β pancréatiques.....	72
1.5.2.2.	Rôle des acides gras dans la sécrétion de l'insuline induite par le glucose.....	73
1.5.2.3.	Acides aminés.....	74
1.5.3.	Signalisation métabolique dans la sécrétion d'insuline.....	75
1.5.3.1.	FCM dérivés des voies anaplérose et cataplérose.....	76
1.5.3.2.	FCM dérivés de l'activité énergétique mitochondriale.....	79
1.5.3.3.	Le Cycle GL/FFA et la signalisation lipidique pour la sécrétion d'insuline.....	79
1.5.3.4.	FCM dérivés du transport des électrons.....	80
1.6.	Hépatocytes et métabolisme énergétique.....	81

1.6.1. Glycogénolyse et gluconéogenèse.....	82
1.6.2. Lipogenèses <i>de novo</i>	87
1.6.3. Régulation du métabolisme énergétique par les voies hormonales et neurales.....	91
1.6.4. Maladies du foie gras non alcoolique.....	94
1.7. Rôle de la Glycérol-3-phosphate phosphatase (G3PP) dans le métabolisme énergétique.....	95
1.7.1. G3PP chez les bactéries et levures.....	96
1.7.2. G3PP chez les plantes.....	98
1.7.3. G3PP chez les poissons et insectes.....	99
1.7.4. Le Glycérol-3-phosphate: métabolite central du métabolisme du glucose et des lipides.....	100
1.8. Problématique et hypothèse du projet de thèse.....	102
1.8.1. Problématique I.....	102
1.8.1.1. Hypothèse I.....	104
1.8.1.2. Objectifs I.....	105
1.8.2. Problématique II.....	105
1.8.2.1. Hypothèse II.....	106
1.8.2.2. Objectifs II.....	106
2. Résultats.....	108
2.1. Article 1.....	109
2.2. Article 2.....	145
3. Discussion.....	194

4. Conclusion.....	214
5. Perspective.....	215
6. Références.....	221

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1. Gènes associés aux différents types de MODY et les phénotypes cliniques associés à des mutations au niveau de ces gènes.
- Tableau 2. Comparaison des définitions du syndrome métabolique

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Prévalence du diabète de type 2

Figure 2. Histoire naturelle du diabète et de la défaillance de la cellule β

Figure 3. Facteurs de risques pour le diabète de type 2

Figure 4. Rôle des voies métaboliques sensibles aux nutriments dans l'induction de la résistance à l'insuline

Figure 5. Mécanisme proposé de la glucolipotoxicité dans la cellule β pancréatique

Figure 6. Les voies anaplérose/cataplérose et cycle du pyruvate

Figure 7. Description du cycle glycérolipides/acides gras libres

Figure 8. Rôle du cycle GL/FFA dans la détoxification des nutriments calorigéniques

Figure 9. Mécanismes impliquées dans la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques β

Figure 10. Signalisation métabolique dans la sécrétion d'insuline

Figure 11. Différentes voies métaboliques générant des facteurs de couplage métaboliques pour la sécrétion d'insuline

Figure 12. Changements du métabolisme énergétique du foie à l'état postprandial, à jeun et lors d'une réalimentation

Figure 13. Illustration partielle du métabolisme du glucose dans le foie

Figure 14. Illustration des différentes voies lipogéniques

Figure 15. Voies d'activation et de signalisation de l'AMPK

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ACL : ATP-citrate lyase

ACSL : Synthétase des acyl-CoA à longue chaîne

AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide

AGE : Produits terminaux de glycation

AGPAT : 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyl transférase

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : Adénosine monophosphate kinase

AQP : Aquaporine

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATF6 : Facteur activant la transcription 6

ATGL : Triglycéride lipase de l'adipocyte

CaMKII : Protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante

CCK : Cholécystokinine

C/EBP : *CCAAT/box Enhancer Binding Protein*

CHOP : Protéine homologue du C/EBP

ChREBP : Élément de réponse des glucides

CoA : Co-enzyme A

CO₂ : Dioxyde de carbone

CPT-1 : Carnitine palmitoyl-transférase allostérique 1

CREB : Élément de réponse se liant à l'AMPc

CRTC2 : Co-activateur transcriptionnel pour le CREB

DAG : Diacylglycérol

DGAT : Diacylglycérol acyl transférase

DHAP : Dihydroxyacétone phosphate

DPP-IV : dipeptidyl-peptidase IV

DT2 : Diabète de type 2

Elovl : Élongase d'acides gras sous forme d'acyl-CoA

ETC : Chaîne de transport d'électrons

FA-CoA : Acide gras sous forme d'acyl-CoA

FAS : Synthase des acides gras

FBPase : Fructose 1,6 biphosphatase

FCM : Facteur de couplage métabolique

FFA : Acide gras libre

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

FOXO1 : *Forkhead box protein O1*

F1,6P : fructose 1,6 biphosphate

F6P : Fructose-6-phosphate

GFAT : Glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase

GIP : Polypeptide insulinothrique dépendant du glucose

GL/FFA : Glycérolipides/acides gras libres

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GLP-1 : Glucagon-like-peptide-1

GLUT-4 : Transporteur de glucose-4

GPAT : Glycérol-3-phosphate acyl-transférase

GPDH : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase

GPR : Récepteur couplé à la protéine G

Gro3P : Glycérol-3-phosphate

GRX : Glutarédoxine redox

GSH : Glutathion réduit

GSK-3 : Glycogène synthase kinase 3

G3PP : Glycérol-3-phosphate phosphatase

G6P : Glucose-6-phosphate

G6Pase : Glucose-6-phosphatase

HAD : Superfamille des haloacides déhalogenases

HDL : Lipoprotéine de haute densité

HGP : Production hépatique du glucose

HGPO : Hyperglycémie provoquée par voie orale

HIF : Facteur induit par l'hypoxie

HNF : Facteur nucléaire des hépatocytes

HOMA : Modèle d'évaluation homéostatique

HOMA-IR : Modèle d'évaluation homéostatique pour la résistance à l'insuline

HSL : Lipase hormono-sensible

IG : Intolérance au glucose

IKK β : Kinase Ikappa β

IL-6 : Interleukine 6

IMC : Indice de masse corporelle

IPF-1 : Facteur du promoteur de l'insuline 1

IP3R : Récepteur de l'inositol-1,4,5-triphosphate

IRE-1 : Protéine nécessitant l'inositol 1

IRS : Substrat du récepteur à l'insuline

JNK : Kinase c-jun N-terminale

K_{ATP} : Canaux potassiques sensible à l'ATP

LCFA : Acide gras à longue chaîne

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LPA : Acide lysophosphatidique

LXR : Récepteur hépatique X

MAG : Monoacylglycérol

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes

MCP-1 : Protéine chémoattractive monocyttaire-1

MKP-3 : Phosphatase des MAPK 3

MODY : Diabète de type adulte chez le jeune

mTOR : Cible de la rapamycine chez les mammifères

NAC : N-acétyl cystéine

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NAFLD : Maladie du foie gras non alcooliques

NASH : Stéato-hépatite non alcoolique

NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B

NTS : Noyau du faisceau solitaire

OIR : Obèse insulino-résistant

OMN : Obèse métaboliquement normal

PA : Acide phosphatidique

PC : Pyruvate carboxylase

PEPCK-C : phosphoénolpyruvate carboxylase cytoplasmique

PERK: *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*

PGC1: Co-activateur des PPAR gamma 1

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKB/AKT: Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PL: Phospholipides

PLA2 : Phospholipase A2

PMA : *Phorbol Myristate Acetate*

PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes

PP2A : *Protein phosphatase 2A*

RE: Réticulum endoplasmique

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

RI : Résistance à l'insuline

ROS : Espèce réactive oxygénée

RXR : Récepteur rétinoïde X

SAPK : Protéine kinase activée par le stress

SCD : Désaturase de stéaroyl-CoA

SCS : Succinyl-CoA synthase spécifique

SHA : Stéatohépatite alcoolique

SIIG : Sécrétion d'insuline induite par le glucose

SIIN : Sécrétion d'insuline induite par les nutriments

SIP-1/2 : Protéase du site 1 ou 2

SIRT1 : Sirtuine 1

SNC : Système nerveux central

SNS : Système nerveux sympathique

SOD : Superoxyde dismutase

SREBP-1 : Élément de régulation des stérols-1

STAT3 : Protéine de transduction et de régulation de la transcription 3

TG : Triglycéride

TLR-4 : Récepteur de type toll-4

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

TZD : Thiazolidinediones

UCP-1 : Protéine découplante-1

UDP : Uridine 5'-diphosphate

UPR : *Unfolded protein response*

VLDL : Lipoprotéine de très basse densité

ZDF : *Zucker Diabetic Fatty*

ZF: *Zucker Fatty*

ZL: *Zucker lean*

*La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais
quoi, il faut avoir de la persévérance, et
surtout de la confiance en soi. Il faut croire
que l'on est doué pour quelque chose, et que
cette chose il faut l'atteindre coûte que coûte.*

--Marie Curie--

DÉDICACE

À ma très chère épouse : **Janvière Kamaliza**

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de m'encourager et de me soutenir durant toutes ces années, tu as toujours été présente à mes côtés quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma très grande reconnaissance. Puisse le bon Dieu te donner bonheur, santé et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

À mes très chers parents : **Astrid Kasine et Abel Dushimimana**

Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières m'ont été d'une importance capitale pour mener à bien mes études.

Je n'ai pas de mots pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous avez fait et que vous ne cessez de faire depuis ma naissance.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consenti pour mon éducation. Que le tout puissant vous accorde santé, bonheur et prospérité.

À mes chers frère et sœurs : **Yvonne, Doris, Dave et Yvette**

Vous avez toujours été présent dans ma vie, et vous n'avez jamais omis de me porter secours quand j'en avais besoin (babysitting etc...). Sans votre aide, je ne serai jamais là où j'en suis actuellement!!

Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie étudiante et personnelle. Veuillez trouver dans ce travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de recherche, le *Dr Marc Prentki*, de m'avoir donné le privilège de travailler parmi son équipe et d'apprécier ses valeurs et ses qualités. Ses compétences, son sérieux et son sens du devoir m'ont énormément marqués.

Jamais je n'aurais pensé travailler dans un aussi grand laboratoire qui en est un de pointe. Mais Marc a cru en moi et m'a fait comprendre que quand il y a la soif d'apprendre tout vient à point à qui sait attendre.

Pour tout ce que vous m'avez donné, Marc, je vous remercie très sincèrement.

Je tiens aussi à remercier énormément mon superviseur, le *Dr Murthy Madiraju*, qui a su me redonner confiance en moi. Merci beaucoup, Murthy, pour votre gentillesse, votre patience et vos précieux conseils. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils.

Je tiens à remercier aussi mon co-superviseur, le *Dr Erik Joly*, à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour ses conseils, sa disponibilité, ses encouragements et ses qualités humaines.

Merci à Dr Shangang Zhao et Dr José Iglesias que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de mes études doctorales. Leur aide inébranlable m'a été d'une importance capitale dans la réalisation de mes projets de recherche. Vos remarques pertinentes et discussions souvent pleines d'humour ont toujours constitué des sources inépuisables d'idées et de réflexions.

Je remercie aussi tous les membres et ex-membres du laboratoire qui m'ont beaucoup aidé, soutenu et encouragé : Dre Marie-Line Peyot, Dr Julien Lamontagne, Dre Camille Attané, Anfal Al-Mass, Dre Pegah Poursharifi, Roxanne Lussier, Johanne Morin, Mélanie Guévremont, Heidi Erb, Dr Dongwei Zhang, Sari Gezzar, Marco Pineda et bien-sûr notre patronne bien aimée, Alix Zutter.

1. INTRODUCTION

1.1 Le Diabète et l'homéostasie du glucose

1.1.1 Impact et croissance du diabète dans le monde

Entre 2010 et 2030, les organisations de santé prévoient une augmentation de 70% environ du nombre d'adultes atteints de diabète dans les pays en voie développement et une augmentation de 20% dans les pays développés (Shaw et al., 2010). Malheureusement, ces prévisions sont soutenues par les dernières statistiques publiées par la Fédération Internationale du Diabète lors du congrès annuel de 2011 de l'Association européenne pour l'étude du diabète et confirment que l'épidémie de diabète continue d'empirer. Le nombre de personnes diabétiques a atteint le nombre astronomique de 387 millions en 2014 (Figure 1) et 1 personne meurt des complications reliées au diabète toutes les 7 secondes, ce qui mène jusqu'à 4,6 millions de décès par année (International Diabetes Federation, 2011 et 2014). Les nouvelles estimations montrent que le nombre de personnes atteintes de diabète en 2030 sera plus près de un demi-milliard, un chiffre beaucoup plus élevé que les 438 millions de personnes prédit il y a quelques années (Lau, 2009). Nous assistons donc à une réelle épidémie de diabètes dans les pays développés et en voie de développement.

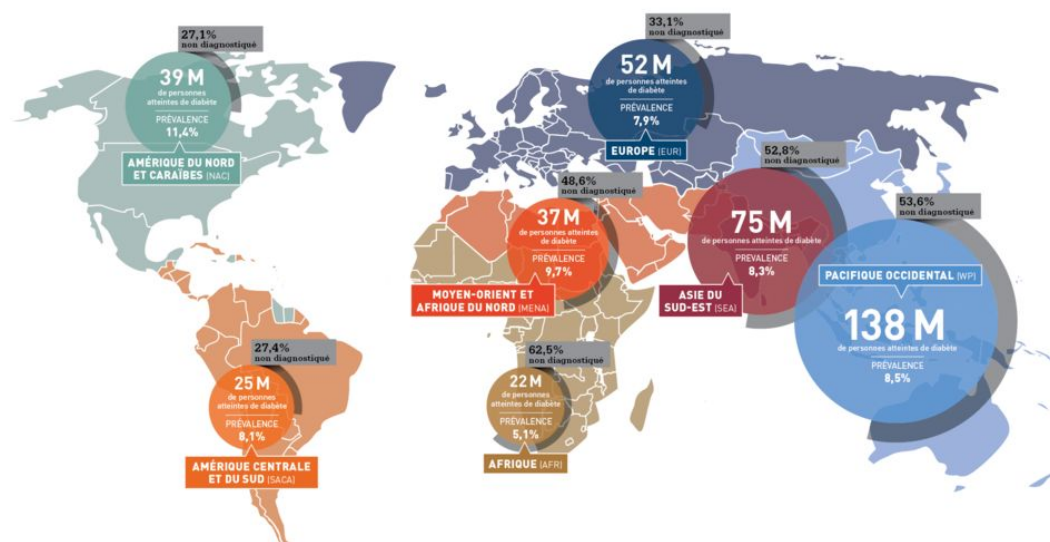


Figure 1. Prévalence du diabète de type 2. Les chiffres représentent le nombre de diabétiques par région. (*Fédération internationale du diabète, 2014*)

1.1.2 Les types de Diabète

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque les cellules β pancréatiques ne produisent pas assez d'insuline et lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser adéquatement l'insuline qu'il produit. Cela se traduit par un taux élevé de sucre dans le sang (glycémie): on parle alors d'hyperglycémie (Organisation Mondiale de la Santé 2013 http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/fr/). Les symptômes du diabète sont les suivants: excrétion excessive d'urine (polyurie), sensation de soif (polydipsie), faim constante, perte de poids, altération de la vision et fatigue. Ces symptômes peuvent être souvent brutaux selon le type du diabète.

Il existe 3 types de diabète : le diabète de type 1, le diabète gestationnel et le diabète de type 2 (DT2). Le diabète de type 1 est principalement le résultat de la destruction des cellules bêta (β) du pancréas. Cette destruction est due à un processus auto-immun dont l'étiologie est actuellement mal comprise. Le diabète gestationnel se caractérise par une intolérance au glucose qui se manifeste pour la première fois ou que l'on dépiste pendant la grossesse (Canadian Diabetes, 2008). Le DT2 représente la forme du diabète la plus répandue avec plus de 90% des diabétiques étant de type 2 et 5% à 10% de type 1 (American Diabetes, 2010). Un style de vie moderne avec un apport excessif de nutriments calorigéniques et une activité physique réduite, a entraîné une augmentation fulgurante d'apparitions de maladies associées à l'obésité, comme le DT2 (Zimmet et al., 2001).

1.1.3 Homéostasie du glucose

Une altération du métabolisme glucidique et lipidique est présente chez des sujets diabétiques de type 2 (Fujioka et al., 1987). Malgré les périodes d'alimentation et de jeûne, la glycémie reste autour de 4 à 7 mmol/l chez des individus normaux. Ce contrôle bien précis de la glycémie est régi par l'équilibre entre l'absorption du glucose au niveau intestinal, la production et la captation hépatique du glucose et le métabolisme glucidique au niveau des tissus périphériques. L'insuline augmente la captation du glucose dans le muscle et le tissu adipeux et inhibe la production hépatique du glucose, ce qui lui procure le rôle de régulateur principal de la concentration du glucose dans le sang. Le glucagon est une hormone produite par le pancréas qui augmente le taux de glucose dans le sang en stimulant la dégradation du glycogène en glucose,

en stimulant la production de glucose à partir d'acides aminés et les acides gras, et la stimulation de la libération de glucose par le foie. Le glucagon et l'insuline ont des effets antagonistes, avec le glucagon qui favorise la production et la libération du glucose dans la circulation et l'insuline qui favorise le transport du glucose sanguin dans les cellules et inhibe la production de glucose. À part ces deux principales hormones, il existe aussi d'autres hormones pouvant réguler l'homéostasie du glucose. Le GLP-1 (glucagon-like-peptide-1), est un peptide sécrété qui agit comme un facteur déterminant de l'homéostasie du glucose du fait de ses capacités à ralentir la vidange gastrique, à augmenter la sécrétion d'insuline et à supprimer la sécrétion du glucagon. Le GLP-1 est sécrété par les cellules L de la muqueuse gastro-intestinale en réponse aux repas, et l'action hypoglycémiante du GLP-1 est arrêtée en raison de sa dégradation enzymatique par la dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) (Nadkarni et al., 2014).

1.2 Pathogenèse du diabète de type 2

1.2.1 Étiologie générale du diabète de type 2

Le DT2 résulte d'un double défaut : l'altération de l'action de l'insuline (résistance à l'insuline) sur les tissus périphériques sensibles à l'insuline (muscle, tissu adipeux et foie), et l'altération de la fonction et/ou de la masse des cellules β du pancréas, résultant donc à une diminution de la sécrétion de l'insuline. Nous verrons plus en détails dans les prochaines sections les rôles de la résistance à l'insuline et la diminution de la sécrétion par les cellules β dans l'étiologie de la maladie.

1.2.2 Histoire naturelle du diabète de type 2

De nombreuses études montrent que l'insulino-résistance précède le développement de l'hyperglycémie chez des sujets qui finissent par développer le DT2 (Lillioja et al., 1988; Martin et al., 1992). Cependant, il a été montré que le DT2 ne se développe que chez des sujets résistants à l'insuline avec un dysfonctionnement au niveau des cellules β pancréatiques (Kahn, 2003; Leahy, 2005; Poitout and Robertson, 2002; Porte, 2001; Prentki et al., 2002). La réponse normale de la cellule β à un apport excessif de nutriments et à la résistance à l'insuline (RI) associée à l'obésité est l'hypersécrétion d'insuline pour maintenir la normoglycémie. Le DT2 ne

se développe alors que chez des sujets qui ne sont pas en mesure de maintenir cette réponse compensatrice des cellules β du pancréas. Des études longitudinales avec des sujets susceptibles au DT2, montrent une augmentation des taux d'insuline pendant les phases de normoglycémie. Ces sujets maintiennent les niveaux de glycémie près de la normale en dépit de la RI : on parle de compensation de la cellule β pancréatique (Figure 2). Cette étape est suivie d'un déclin lorsque la glycémie à jeun dépasse la limite supérieure de la normale de 5,5 mmol/l : on parle de décompensation de la cellule β pancréatique (la cellule β est défaillante) (Leahy, 2005). Une autre étude longitudinale chez les indiens Pima a montré que la dysfonction des cellules β était le principal déterminant de la progression de l'état de normoglycémie au diabète (Weyer et al., 1999). En outre, l'histoire naturelle du DT2 implique une détérioration progressive de la fonction de la cellule β (Leahy, 2005), associée à la perte de leur masse cellulaire par apoptose (Butler et al., 2003). Beaucoup de personnes touchées par la maladie qui ont initialement un contrôle adéquat de leur glycémie simplement avec des modifications de leur mode de vie auront besoin d'un traitement à l'insuline dans un stade ultérieur de la maladie.

Sans la production adéquate d'insuline, les cellules, en particulier celles des tissus périphériques (muscle, tissu adipeux et foie), ne peuvent capter suffisamment de glucose en circulation dans le sang, d'où l'élévation de la glycémie. Cette anomalie mène à une exposition perpétuelle de la cellule β à des niveaux élevés de glucose entraînant ainsi une détérioration de sa fonction et une hyperinsulinémie compensatrice afin de maintenir l'euglycémie. Au fil du temps, une détérioration fonctionnelle des cellules β va empêcher le maintien des niveaux élevés de sécrétion d'insuline. Se développent alors progressivement une intolérance au glucose (IG) et éventuellement un DT2 (Figure 2) (DeFronzo et al., 1992; Prentki and Nolan, 2006). En plus de causer une hyperglycémie dans le DT2, la résistance à l'insuline (RI) et l'hyperinsulinémie compensatrice jouent un rôle dans d'autres anomalies métaboliques et vasculaires.

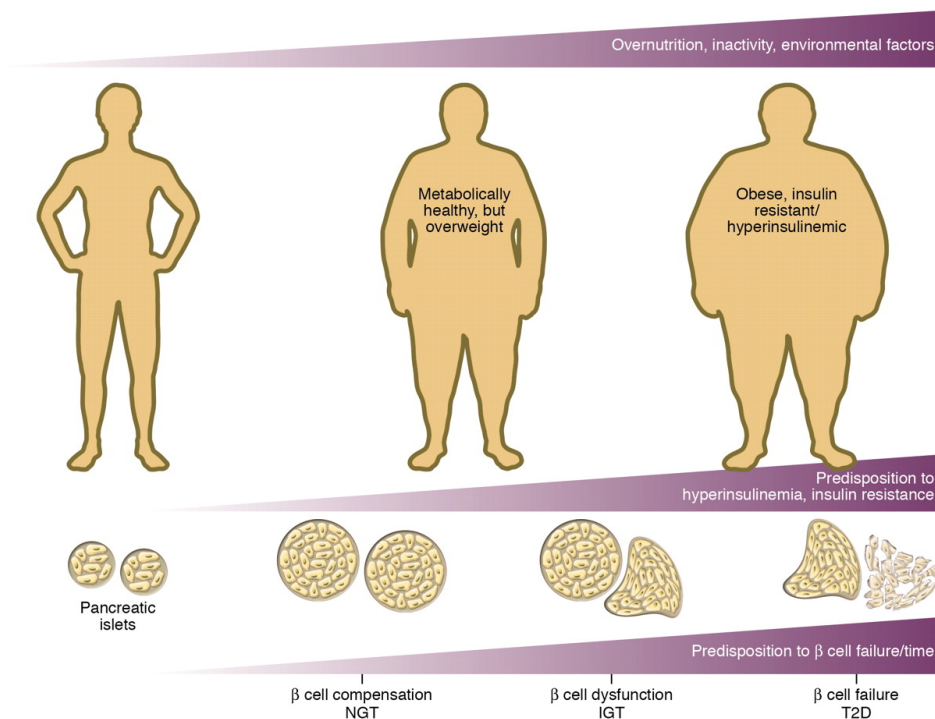


Figure 2. Histoire naturelle du diabète et la défaillance de la cellule β . La résistance à l'insuline associée à l'obésité implique la surnutrition, l'inactivité et divers facteurs environnementaux et génétiques. La résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques pousse les cellules β à proliférer et à sécréter plus d'insuline afin de maintenir une glycémie normale. Si la compensation en insuline par les cellules β échoue, une hyperglycémie apparaît, amplifiant la défaillance et possiblement la mort des cellules β et ainsi l'apparition du diabète de type 2. (Prentki M. et al. *J. Clin. Invest.* 2006 Jul;116(7):1802-12)

1.2.3. Différentes formes du diabète de type 2 et génétique associée

Le DT2 est un trouble métabolique avec une étiologie complexe comportant plusieurs facteurs génétiques (Morris et al., 2012; Sladek et al., 2007) et environnementaux (Figure 3). Par conséquent, il existe plusieurs formes de DT2 pouvant varier sensiblement dans leurs caractéristiques cliniques, notamment l'âge du diagnostic et l'indice de masse corporelle (Ozcan et al.) (Perry et al., 2012). Les facteurs environnementaux, en particulier les habitudes alimentaires et la sédentarité, sont connus pour jouer un rôle majeur dans le développement de cette maladie. Comme nous le verrons en détails plus loin, l'obésité est étroitement associée avec l'apparition du DT2. Autour de 90% des personnes atteintes de DT2 sont obèses ou en surpoids. Cependant, un IMC normale est présent chez un certain nombre de patients atteints du DT2 (Perry et al., 2012), ce qui suggère que des facteurs non liés à l'obésité, par exemple la génétique, sont impliqués dans le développement du DT2. Plusieurs études ont pu démontrer qu'il existait une hétérogénéité génétique entre les sujets diabétiques de type 2 obèses et non-obèses (Cauchi et al., 2008a; Cauchi et al., 2008b; Guey et al., 2011; Timpson et al., 2009). Perry et al. (Perry et al., 2012), ont pu confirmer que les facteurs génétiques contribuant directement au développement du DT2 indépendamment des facteurs environnementaux sont les plus fortement associés au DT2 chez les patients non obèses que chez les patients obèses. De nouvelles technologies de criblage des polymorphismes (SNP : Small nucleotide polymorphism) ont permis d'identifier une centaine de polymorphismes et plusieurs loci tels que ACDC, CAPN10, ENPP1, HNF4A, SLC308A, IDE-KIF11, EXT2-ALX4 ont été identifiés et associés au DT2 (Morris et al., 2012; Sladek et al., 2007). Malgré l'identification de nombreux gènes, appelé gènes de susceptibilité associés au DT2 polygénique, leur rôle dans le développement de cette maladie reste encore mal connu.

Il existe aussi une autre catégorie de gènes, appelés MODY. Le diabète de type MODY est une forme particulière de diabète monogénique, différente du diabète auto-immun de type 1. Il est particulièrement en relation avec une anomalie de la sécrétion d'insuline, donc d'un défaut de la fonction de la cellule β pancréatique. Cette forme relativement rare de diabète représente environ 2% des diabètes sucrés. Ce type de diabète se manifeste en générale avant l'âge de 25 ans principalement dès l'enfance ou l'adolescence, d'où le nom : Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY), ou diabète de type adulte chez le jeune (Fajans et al., 2001). C'est un diabète

familial, avec une hérédité autosomique dominante. Le MODY peut résulter principalement de mutations d'au moins six gènes (Tableau 1). Un de ces gènes code pour une enzyme glycolytique appelée glucokinase (associé au MODY 2) (Froguel et al., 1993), et les cinq autres codent pour des facteurs de transcription : HNF (hepatocyte nuclear factor) 4 α (associé au MODY 1) (Consortium et al.), HNF1 α (MODY 3) (Yamagata et al., 1996), IPF-1 (insulin promotor factor 1) (MODY 4) (Stoffers et al., 1997), HNF1 β (MODY 5) (Horikawa et al., 1997) et le NeuroD1 (neurogenic differentiation factor 1), aussi connu sous le nom de BETA2 (beta-cell E-box transactivator 2) (MODY 6) (Malecki et al., 1999). Tous ces gènes sont bien exprimés dans la cellule β et leur mutation mène à leur dysfonction et au diabète.

MODY TYPE	GENE	CLINICAL FEATURES OF HETEROZYGOUS STATE†	MOST COMMON TREATMENT	MOLECULAR BASIS	CLINICAL FEATURES OF HOMOZYGOUS STATE
MODY 1	HNF-4 α	Diabetes; microvascular complications (in many cases); reductions in serum concentration of triglycerides, apolipoproteins AII and CIII, and Lp(a) lipoprotein	Oral hypoglycemic agent, insulin	Abnormal regulation of gene transcription in beta cells, leading to a defect in metabolic signaling of insulin secretion, beta-cell mass, or both	
MODY 2	Glucokinase	Impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, diabetes, normal proinsulin-to-insulin ratio in serum	Diet and exercise	Defect in sensitivity of beta cells to glucose due to reduced glucose phosphorylation; defect in hepatic storage of glucose as glycogen	Permanent neonatal diabetes, requiring insulin treatment
MODY 3	HNF-1 α	Diabetes, microvascular complications (in many cases), renal glycosuria, increased sensitivity to sulfonylurea drugs, increased proinsulin-to-insulin ratio in serum	Oral hypoglycemic agent, insulin	Abnormal regulation of gene transcription in beta cells, leading to a defect in metabolic signaling of insulin secretion, beta-cell mass, or both	
MODY 4	IPF-1	Diabetes	Oral hypoglycemic agent, insulin	Abnormal transcriptional regulation of beta-cell development and function	Pancreatic agenesis and neonatal diabetes, requiring insulin treatment
MODY 5	HNF-1 β	Diabetes; renal cysts and other abnormalities of renal development; progressive nondiabetic renal dysfunction, leading to chronic renal insufficiency and failure; internal genital abnormalities (in female carriers)	Insulin	Abnormal regulation of gene transcription in beta cells, leading to a defect in metabolic signaling of insulin secretion, beta-cell mass, or both	
MODY 6	NeuroD1, or BETA2	Diabetes	Insulin	Abnormal transcriptional regulation of beta-cell development and function	

Tableau 1. Gènes associés aux différents types de MODY et les phénotypes & signes cliniques associés à des mutations au niveau de ces gènes (Fajans SS et al. *N Engl J Med.* 2001 Sep 27;345(13):971-80).

Le DT2 associée à l'obésité est la forme la plus commune. En effet, l'épidémie d'obésité est en grande partie à l'origine de la prévalence grandissante du diabète. Le principal lien entre le DT2 et l'obésité est la RI. Cependant, la RI n'est pas le seul facteur à l'origine du DT2 chez les patients obèses, d'autant plus qu'elle peut s'avérer protectrice pour certains tissus du système

cardiovasculaire tel que le cœur et le muscle (Nolan et al., 2015). Chez les personnes présentant une RI, comme nous l'avons déjà mentionné, l'hyperglycémie apparaît seulement quand les cellules β pancréatiques ne sont plus en mesure de sécréter suffisamment d'insuline pour compenser cette RI dans les tissus périphériques. Ainsi, la RI et la dysfonction de la cellule β pancréatique sont les deux principaux facteurs dans le développement du DT2 associé à l'obésité. Les différents rôles de chacun de ces facteurs sont discutés plus en détail dans les paragraphes suivants.

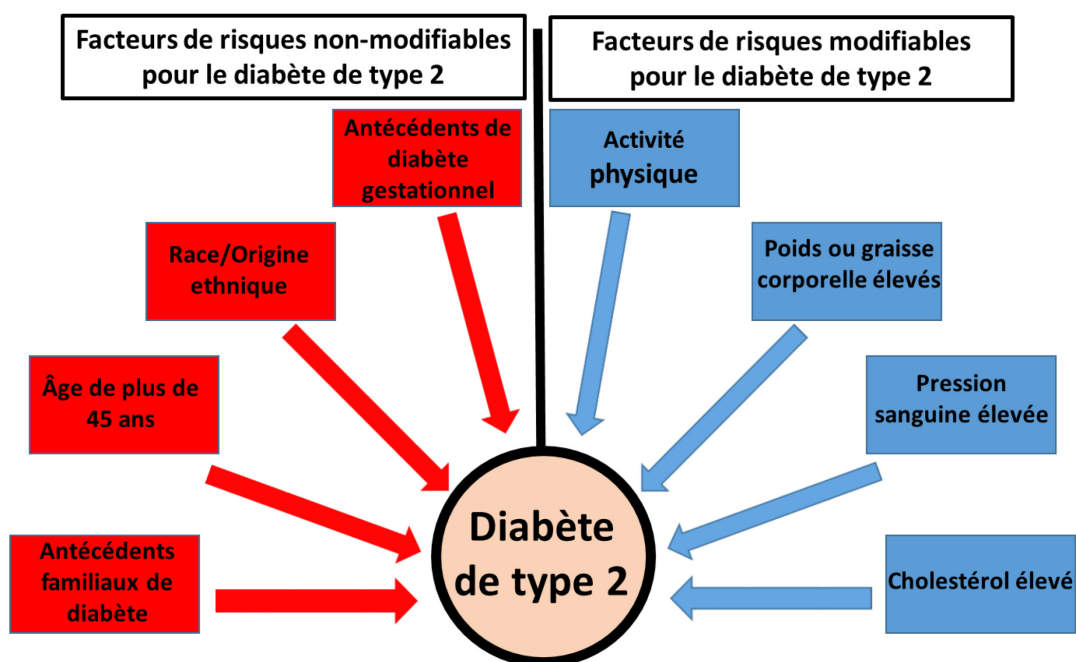


Figure 3. Facteurs de risques pour le diabète de type 2.

1.2.4. Résistance à l'insuline (RI)

L'insuline est une hormone essentielle dans la régulation du fonctionnement de l'organisme. Elle exerce ses effets métaboliques principalement sur les tissus périphériques. Ceux-ci incluent les effets inhibiteurs de l'insuline sur la production endogène de glucose par le foie, les effets stimulants de l'insuline sur la captation périphérique du glucose (principalement au niveau du muscle squelettique) et enfin les effets inhibiteurs de l'insuline sur la lipolyse au niveau du tissu adipeux. L'insensibilité à l'insuline, communément appelé «résistance à l'insuline» est sous contrôle de différents facteurs de risques génétiques et environnementaux et constitue un élément déterminant dans le développement du DT2. La RI au niveau du tissu adipeux se traduit par une lipolyse accrue et est associée à une libération systémique accrue d'acides gras libres (Sluse et al.) et de cytokines, facteurs contribuant au développement de la RI dans le foie et les muscles. Au niveau hépatique, la RI entraîne une augmentation de la production du glucose, des lipoprotéines de très faibles densité (VLDL) et des triglycérides (TG) alors qu'au niveau du muscle squelettique, la captation du glucose est atténuée.

1.2.4.1. Contributions à la RI de tissus spécifiques

Comme cité précédemment, l'insuline exerce ses effets métaboliques principalement au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique. Chez les individus insulino-résistants, ces défauts dans la capacité d'action de l'insuline tendent à coexister (Groop et al., 1989) accentuant ainsi l'intensité de la RI. Un facteur majeur du développement de la RI est une surabondance de FFA circulants, principalement due à la plus grande masse de tissu adipeux présente chez les sujets obèses. Lorsqu'ils atteignent et s'accumulent dans les tissus sensibles à l'action de l'insuline, les FFA excédentaires provoquent une RI.

L'hypothèse la plus acceptée est que cette insensibilité à l'insuline débiterait dans le tissu adipeux, du moins chez des personnes obèses. L'effet paracrine et endocrine de l'état pro-inflammatoire se combine à et contribue à la RI provoquée par un excédent de FFA. Produite par différents types de cellules dans le tissu adipeux incluant les adipocytes et les macrophages dérivés des monocytes, la stimulation de la sécrétion de l'interleukine 6 (IL-6) et du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), entre autres, entraîne une plus forte RI du tissu adipeux et une

augmentation encore plus grande de la lipolyse des TG entraînant ainsi une libération accrue des FFA dans la circulation (de Luca and Olefsky, 2008). Les taux circulants d'IL-6 et des autres cytokines dérivés du tissu adipeux augmentent également et peuvent à distance intensifier la production de glucose et de VLDL par le foie ainsi que la RI dans les muscles. Voici plus en détails l'impact de la RI sur les trois tissus principaux sensibles à l'insuline.

A) Au niveau hépatique. L'insuline agit via son récepteur à activité tyrosine kinase afin de freiner la production hépatique de glucose, stimuler la synthèse de glycogène et la lipogenèse et induire l'exportation de TG sous forme de VLDL. Dans la RI hépatique, l'insuline n'arrive plus à stopper la production hépatique de glucose produite par la gluconéogenèse, ce qui entraîne une hyperglycémie à jeun. La lipogenèse au niveau hépatique reste pour sa part augmentée à cause d'une activation directe du facteur de transcription SREBP-1. En raison d'une disponibilité accrue d'acides gras, dû à la RI dans le tissu adipeux, il y a production élevée de VLDL riches en TG. Un déséquilibre entre la voie de la synthèse des TG et les voies d'oxydation des acides gras est à l'origine d'une stéatose métabolique (Capeau, 2008). Une augmentation intracellulaire de composés dérivés d'acides gras est responsable de l'activation de diverses kinases sensibles au stress (SAPKs/JNKs), entraînant une phosphorylation des résidus sérines des substrats du récepteur à l'insuline et diminuant ainsi la transmission du signal de l'insuline (Petersen and Shulman, 2006). Ceci est l'hypothèse la plus acceptée. En appui avec l'hypothèse que la RI hépatique est induite par la présence de dérivé d'acide gras, une diminution de la RI résultant d'une perte de poids chez des sujets obèses ou d'un traitement par des agents insulino-sensibilisateurs tels les thiazolidinediones (TZD) est associée à une diminution de la stéatose hépatique (Petersen et al., 2005; Tiikkainen et al., 2004; Utzschneider and Kahn, 2006).

B) Dans le muscle squelettique. Le muscle squelettique est quantitativement le tissu le plus important impliqué dans l'homéostasie glucidique, puisqu'il capte à peu près 80% du glucose ingéré (Jackson et al., 2000; Warram et al., 1990). De ce fait, une diminution de la capacité de l'insuline à stimuler la captation du glucose par ce tissu est d'une importance considérable pour l'homéostasie glucidique de l'organisme. Chez les individus insulino-résistants, la captation du glucose et la synthèse de glycogène dans le muscle sont fortement réduites (Kelley et al., 1992). Tsao et collègues (Tsao et al., 1999)

ont montré l'absence d'hyperglycémie chez des souris dont l'expression génique du transporteur de glucose GLUT4 est supprimée, ce qui laisse croire que les anomalies du métabolisme glucidique au niveau musculaire chez les patients insulino-résistants et diabétiques de type 2 ne s'explique pas seulement par le fait que la captation du glucose induite par l'insuline est altérée (Ebeling et al., 1998). À ce sujet, il est important de rappeler le rôle central attribué au tissu adipeux viscéral dans la pathogenèse de l'insulino-résistance (Bjorntorp, 1988), qui en libérant une quantité accrue de FFA dans le système porte, serait à l'origine d'une RI au niveau musculaire.

C) Dans le tissu adipeux viscéral. Le rôle du tissu adipeux viscéral dans les maladies métaboliques telles que le DT2, la RI et le syndrome métabolique, a fait l'objet de plusieurs travaux ces dernières années et plusieurs études récentes ont pu démontrer que l'adiposité viscérale et non l'adiposité sous-cutanée ou totale, est associée de manière indépendante à la RI (Lebovitz and Banerji, 2005). La RI au niveau du tissu adipeux est caractérisée par une diminution de la suppression de la lipolyse par l'insuline avec augmentation de la libération de FFA dans la circulation. La capacité de l'insuline à réguler les niveaux plasmatiques de FFA est altérée chez les individus obèses et non obèses insulino-résistants (Abbasi et al., 2000; Campbell et al., 1994) et ce défaut apparaît très tôt chez les individus qui ont des prédispositions génétiques à la RI (Eriksson et al., 1999; Gelding et al., 1995). Cette altération métabolique contribue au développement de la RI au niveau hépatique et musculaire.

1.2.4.2 Signes cliniques de la RI

Les signes cliniques permettant de suspecter la RI sont assez semblable à ceux du DT2. Une personne résistante à l'insuline a souvent une glycémie à jeun élevée, mais certains patients présentant une RI peuvent avoir une glycémie normale (à jeun et après les repas), et pourraient même passer un test de tolérance au glucose (HGPO : hyperglycémie provoquée par voie orale) avec succès. En fait, certaines personnes atteintes de RI peuvent connaître des changements rapides de glycémie et même souffrir de crises d'hypoglycémie. Mais afin de maintenir une glycémie normale, une personne qui est résistante à l'insuline va devoir produire énormément d'insuline, donc elle se retrouve en hyperinsulinémie. La RI peut également être une indication d'une autre maladie sous-jacente ou d'un trouble tel que la maladie d'Addison, le syndrome des

ovaires polykystiques (SOPK), et le syndrome de Cushing. Il existe tout de même quelques signes physiques importants permettant de suspecter une RI. 1) Une hyperpigmentation de la peau; 2) Des taches sur la peau; 3) Gagner du poids sans changer ses habitudes alimentaires; 4) Des femmes et des filles ayant des périodes menstruelles irrégulières ou absentes devraient être examinées pour détecter d'éventuels signes d'insulinorésistance; 5) Un excès de pilosité faciale et corporelle, en particulier chez les filles et les femmes, peut être un autre signe de RI. Des personnes résistantes à l'insuline peuvent avoir également d'autres problèmes de santé tels qu'une pression sanguine élevée, le tour de taille élevé, des niveaux de LDL, cholestérol et de TG élevés, des niveaux de HDL (bon cholestérol) bas, les troubles du sommeil, sautes d'humeur rapides et des problèmes d'infertilités.

1.2.4.3 Mesure physiologique de la RI

La RI peut être mesurée de plusieurs façons. La méthode la plus utilisée chez l'humain est le *HOMA-IR*. Le HOMA-IR (Homeostatic model assessment) est une méthode pour évaluer la RI à partir des valeurs basales de la glycémie (à jeun) et de l'insuline ou du peptide C (Wallace et al., 2004). Il faut être à jeun depuis 12 heures. La formule de calcul est la suivante : ***HOMA-IR = Insuline X Glucose / 22,5***. Les patients ayant un index de HOMA-IR supérieur à 3 sont insulino-résistants (Matthews et al., 1985). Cependant, la technique d'évaluation la plus fiable et qui demeure la méthode de référence est celle dite du "*clamp test euglycémique hyperinsulinémique*". Cette dernière consiste à injecter au patient de l'insuline pendant une durée de deux à trois heures et à calculer la quantité de glucose à perfuser pour maintenir la glycémie constante (Kim, 2009). L'utilisation de cette technique est lourde et difficilement réalisable au quotidien. Elle se limite donc à un contexte de recherche clinique uniquement. En raison de la complexité de cette technique, le calcul de l'index de HOMA vient considérablement simplifier les choses.

1.2.4.4 Conditions pathologiques associées à la RI

1.2.4.4.1 Obésité

L'obésité représente le principal facteur de risque de développement d'une RI chez les enfants et les adolescents (Caprio, 2002), et le couple RI/hyperinsulinémie est considéré comme un lien entre l'obésité, les anomalies métaboliques et les risques cardiovasculaires associés (Weiss and

Kaufman, 2008). Environ 55% de la variation de sensibilité à l'insuline peut s'expliquer par l'adiposité, en particulier viscérale, et ce après ajustement pour d'autres facteurs confondants, telles que l'âge, le sexe, l'ethnie et le stade de développement pubertaire (Caprio, 2002). Les individus obèses présentent une hyperinsulinémie et une RI avec un métabolisme glucidique total diminué de 40% comparativement aux individus non obèses (Caprio et al., 1996). Une étude menée chez des adolescents américains a montré l'existence d'une RI chez près de 50% des sujets obèses (Lee et al., 2006), l'adiposité est le facteur le plus important affectant la sensibilité à l'insuline. A noter cependant que Stefan et al. (Stefan et al., 2008) ont démontré l'existence de sujets obèses métaboliquement normaux (OMN) et ont proposé un mécanisme pour expliquer ce phénomène. Ces sujets atteints d'obésité métaboliquement bénigne présentent des quantités de gras viscéral, hépatique et musculaire moindres que celles retrouvées chez des sujets obèses insulino résistants. Ces caractéristiques métaboliques suggèrent que les OMN ont une meilleure capacité à capter les FFA au niveau du tissu adipeux sous-cutané en particulier et ceci pourrait expliquer, du moins en partie, la bonne sensibilité à l'insuline de ces sujets. Ces données ont été appuyées par les travaux de Succurro et al., (Succurro et al., 2008) qui ont montré, chez les OMN, des niveaux de FFA plasmatique similaires à ceux des sujets normaux et nettement inférieurs à ceux rencontrés chez les sujets obèses insulino-résistants (OIR).

1.2.4.4.2 Intolérance au glucose et les hormones incrétines

L'intolérance au glucose, un état caractérisé par une légère hausse de la glycémie à jeun, précède typiquement le DT2 (Polonsky et al., 1996). Cependant, l'intolérance au glucose est sous-diagnostiquée même chez des populations à risque (Harris et al., 1987; King and Rewers, 1993), car elle est généralement asymptomatique et sa détection nécessite un test de tolérance au glucose (HGPO) et ce test n'est pas prescrit d'emblée. Les connaissances actuelles suggèrent que généralement le développement de l'intolérance au glucose est initiée par la RI et aggravée indirectement par l'hyperinsulinémie compensatrice (Nathan et al., 2007). Cependant, l'intolérance peut aussi survenir dans d'autres contextes. Par exemple, elle peut être présente chez de nombreux patients atteints de cirrhose due à une diminution de l'absorption de glucose hépatique et de la synthèse du glycogène (Tietge et al., 2004). La présence de l'intolérance peut également se produire en cas d'urémie, à la suite de l'augmentation de la résistance périphérique à l'action de l'insuline (Smith and DeFronzo, 1982).

Les cellules endocrines du tractus gastro-intestinal jouent un rôle important dans la régulation de la tolérance au glucose (Vella et al., 2004). Les hormones incrétines telles que le glucagon like peptide-1 (GLP-1) et le glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) sont sécrétées par les cellules intestinales L et K, respectivement, suite au passage des aliments après leur ingestion. Le GLP-1 et le GIP sont les deux gluco-incrétones importantes qui jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du glucose via la sécrétion d'insuline. L'identification du GIP et du GLP-1 a suivi l'observation intéressante de différents niveaux d'insuline observés en réponse au gavage oral vs l'injection intrapéritonéale de glucose. Le gavage oral induit des niveaux plus élevés d'insuline que l'injection intrapéritonéale, indiquant que certaines hormones du tractus gastro-intestinal ou d'autres signaux contribuent à ce processus. On estime aujourd'hui que le GLP-1 et GIP contribuent pour plus de 50% du total de la sécrétion d'insuline post-prandiale (Vilsboll et al., 2003). La stimulation de la sécrétion d'insuline médiée par GLP-1 ne semble pas impliquer les métabolites dérivés des nutriments et le métabolisme énergétique de la cellule β pancréatique des rongeurs (Peyot et al., 2009a). Le GLP-1 et le GIP jouent leur rôle dans la sécrétion d'insuline via leurs récepteurs spécifiques, situés à la surface des cellules afin de générer des molécules de signalisation, telles que l'AMPc et le Ca^{2+} , déclenchant ainsi l'exocytose de l'insuline. Les souris déficientes en récepteur GIP présente une intolérance au glucose avec une réponse insulinaire initiale altérée après une prise orale de glucose (Yabe and Seino, 2011). De plus, l'expression ectopique de GIP dans les cellules β maintient la sécrétion d'insuline en l'absence de peptides dérivés du pro-glucagon, ce qui suggère la présence d'un nouveau mécanisme de compensation pour le maintien de l'action des hormones incrétines dans les îlots de Langerhans (Fukami et al., 2013). De même, les souris déficientes en récepteur au GLP-1 sont également intolérantes au glucose avec une réduction des niveaux d'insuline plasmatique. L'effet des agonistes du récepteur au GLP-1 dans l'induction de la sécrétion d'insuline dépend du glucose. En absence des niveaux élevés de glucose, le GLP-1 montre très peu ou pas d'effet sur la sécrétion d'insuline. Il a été démontré que le GLP-1 de la veine porte stimule la sécrétion d'insuline principalement à travers les voies de réflexes vagues hépatoportale-pancréatiques (Nishizawa et al., 2013). Outre cela, une activation aigue du récepteur au GLP-1 central améliore l'action de l'insuline hépatique et la sécrétion d'insuline chez les rats nourris avec une diète riche en gras et résistant à l'insuline. Ainsi, le GLP-1 régule la sécrétion d'insuline probablement aussi via une action centrale.

L'importance des hormones incrétines a été constatée à la suite de résultats obtenus dans le développement d'agents pouvant améliorer le contrôle glycémique chez les patients diabétique de type 2 par de nouveaux mécanismes (Joy et al., 2005). Ces stratégies comprennent l'inhibition de la dipeptidyl peptidase IV (DPP-4), la principale enzyme responsable de la dégradation des hormones incrétines *in vivo*, et l'utilisation d'agonistes du récepteur au GLP-1 (Ahren, 2005).

1.2.4.4.3 Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique, un état d'insulino-résistance également connu sous le nom de syndrome X ou de syndrome de la RI, a attiré une grande attention en raison de son impact sur la santé publique. Il existe de nombreux critères de diagnostics du syndrome métabolique et les organisations de santé ne s'entendent pas toutes sur l'établissement d'une norme. Les critères de diagnostic les plus couramment utilisés aux États-Unis sont ceux du National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III (NCEP / ATPIII) (Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in, 2001) (Tableau 2). L'Organisation Mondiale de la Santé (Alberti and Zimmet, 1998) et le "European Group for the Study of Insulin Resistance" (EGSIR) (Balkau and Charles, 1999) ont, eux aussi, établi leurs propres critères pour définir le syndrome métabolique. Ces trois définitions sont en accord sur les certaines composantes du syndrome métabolique soit l'intolérance au glucose, l'obésité, l'hypertension et la dyslipidémie, mais cependant différent sur d'autres critères (Tableau 2). Les définitions de l'OMS et l'EGSIR sont les plus proches, incluant toutes deux l'intolérance au glucose ou la résistance à l'insuline comme composante essentielle du syndrome métabolique (Alberti and Zimmet, 1998; Balkau and Charles, 1999), ce critère n'étant pas inclus dans la définition du NCEP/ATP III.

La RI est le facteur le plus largement acceptée pour expliquer la physiopathologie du syndrome métabolique. Cependant, des études épidémiologiques indiquent qu'une importante proportion de patients souffrant de syndrome métabolique n'ont pas de signes de RI, et que la corrélation entre la RI et les différentes composantes de ce syndrome est modérée (Mikhail, 2009). L'obésité est considérée par plusieurs comme le facteur pathogénique du syndrome métabolique, pouvant être à l'origine ou pouvant aggraver la RI (Bouchard et al., 1993). Cependant, comme la RI, l'obésité n'est pas universelle chez les sujets présentant un syndrome métabolique et certains sujets obèses n'ont pas d'anomalies métaboliques (Messier et al., 2010).

WHO, 1999	European Group for the Study of Insulin Resistance, 1999		ATP III, 2001
Diabète ou altération de la glycémie à jeun ou intolérance au glucose ou résistance à l'insuline (clamp euglycémique-hyperinsulinémique : absorption du glucose en dessous des 25%)	Résistance à l'insuline-hyperinsulinémique: au-dessus des 25% de l'insuline à jeun		
	Valeurs d'une population non-diabétique		
Plus de 2 ou plus des éléments suivants: Obésité: IMC 30 ou rapport taille-hanche >0.9 (homme) ou >0.85 (femme)	Plus de 2 ou plus des éléments suivants: Obésité centrale: tour de taille >94 cm (homme) or >80 cm (femme)	Plus de 3 ou plus des éléments suivants: Obésité centrale: tour de taille >102 cm (homme), >88 cm (femme)	
Dyslipidémie: triglycérides ≥ 1.7 mmol/L ou cholestérol HDL <0.9 (homme) ou <1.0 (femme) mmol/L	Dyslipidémie: triglycérides >2.0 mmol/L ou cholestérol HDL <1.0	Hypertriglycéridémie: triglycérides ≥ 1.7 mmol/L Cholestérol HDL bas : <1.0 mmol/L (homme), <1.3 mmol/L (femme)	
Hypertension : pression sanguine >140/90 mm Hg Microalbuminurie: excrétion de l'albumine >20 µg/min	Hypertension: pression sanguine $\geq 140/90$ mm Hg et/ou prise de médicaments	Hypertension: pression sanguine $\geq 135/85$ mm Hg ou prise de médicaments	
	Glycémie à jeun ≥ 6.1 mmol/L	Glycémie à jeun ≥ 6.1 mmol/L	

Tableau 2. Comparaison des définitions du syndrome métabolique (adapté de Eckel et al., Lancet, 2005 ; 365 :1415-1428).

1.2.4.5 Mécanismes cellulaires et moléculaires de la RI

1.2.4.5.1. Glucotoxicité

L'hyperglycémie chronique (symptôme associée à l'intolérance au glucose et au diabète) est une des principales causes d'une RI en augmentant le stress oxydatif, la formation de produits terminaux de glycation (AGEs) et le flux à travers la voie de biosynthèse des hexosamines et finalement en activant la voie du diacylglycérol (DAG) et de la protéine kinase C (PKC) (Brownlee, 2005; Goldberg and Dansky, 2006; Reusch, 2003).

A) Stress oxydatif

L'hyperglycémie augmente la production d'espèces réactives oxygénées (ROS). Cet effet est inhibé en présence de découpleurs de la phosphorylation oxydative mitochondriale ou par surexpression cellulaire de la "uncoupling protein-1" (UCP-1) ou de la superoxyde manganèse dismutase. Ces traitements préviennent en outre l'activation de la PKC induite par le glucose, la formation des AGEs, l'accumulation de sorbitol et l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) (Nishikawa et al., 2000). Une augmentation de ROS se traduit par une RI accompagnée d'une altération de la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 stimulée par l'insuline et de la captation du glucose. Les antioxydants, tels l'acide α -lipoïque, préviennent les effets délétères des ROS sur le transport du glucose *in vivo* et *in vitro* (Haber et al., 2003; Maddux et al., 2001; Rudich et al., 1998). Une augmentation du stress oxydatif est associée à la stimulation de nombreuses sérine/thréonine kinases et à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et de la protéine activatrice-1 (AP-1), qui contribuent au développement de la RI. Ainsi l'activation des *jun* kinase (JNK), PKC et de la kinase Ikappa β (IKK β) mène à la phosphorylation d'une sérine de l'IRS-1 et altère la capacité de celle-ci à activer la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). La diminution de l'activation des kinases en aval, telles la sérine/thréonine protéine kinase B (PKB/Akt) et la PKC- ζ , se traduit par une diminution de la translocation des GLUT4 et du transport du glucose (Furukawa et al., 2004; Gao et al., 2002; Hirosumi et al., 2002).

B) Voie de biosynthèse des hexosamines

Une augmentation du flux du glucose via la voie de biosynthèse des hexosamines est un autre mécanisme par lequel l'hyperglycémie pourrait induire une RI (Buse, 2006). La glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT) est l'enzyme limitant de cette voie (Figure 4), dont le produit final est l'uridine 5'-diphosphate (UDP)-N-acétylglucosamine (GlcNAc). Ce

dernier est le substrat de la O-GlcNAc transférase, responsable de la modification post-traductionnelle de protéines. Une surexpression de GFAT chez la souris cause la RI (Veerababu et al., 2000). La voie de biosynthèse des hexosamines peut agir comme un senseur nutritionnel qui joue un rôle dans la RI et les complications vasculaires en causant des modifications de la O-GlcNAc. Ainsi, une augmentation de O-GlcNAcylation, un type de O-glycosylation d'une protéine où le GlcNAc s'attache aux résidus sérine et thréonine via des liaisons O-glycosidiques, peut, en altérant des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline dont l'IRS-1 (Rossetti, 2000), induire une réduction de la translocation des GLUT4 stimulée par l'insuline et une diminution de la captation du glucose (Ball et al., 2006; Baron et al., 1995).

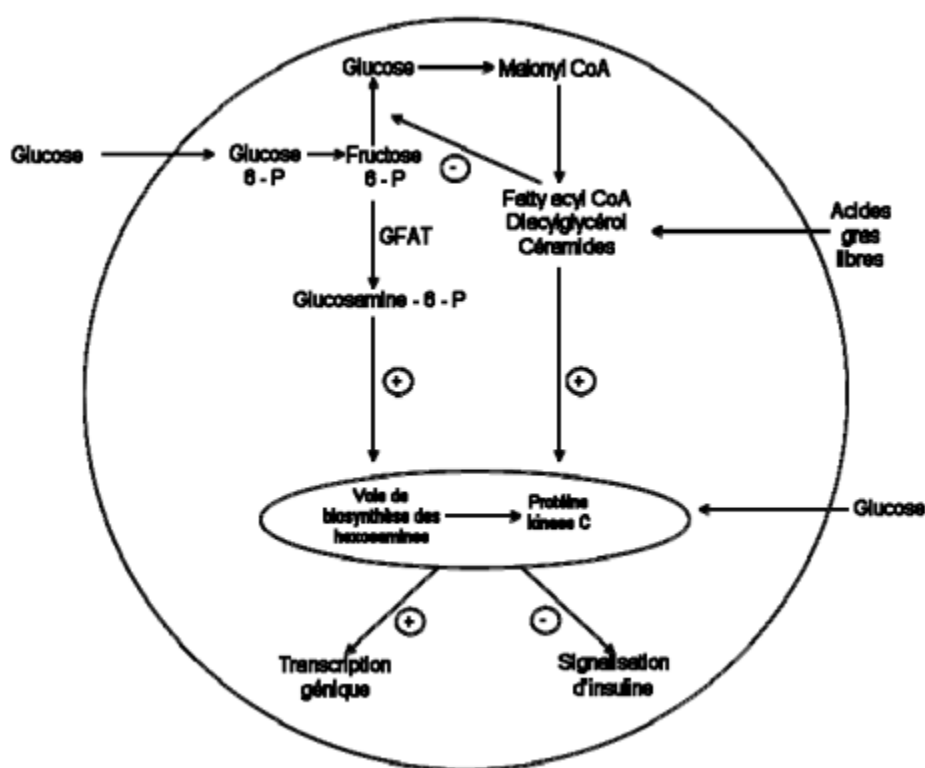


Figure 4. Rôle des voies métaboliques sensibles aux nutriments dans l'induction de la résistance à l'insuline. Le glucose est phosphorylé pour produire le glucose-6-phosphate qui est principalement utilisé dans la glycolyse via la production du fructose-6-phosphate. La voie de biosynthèse des hexosamines reçoit approximativement 1-3% du glucose entrant via la conversion du fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate par l'enzyme glutamine: fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT). Une augmentation de la disponibilité des FFA génère des niveaux accrus d'acides gras sous forme d'acyl-CoA, de DAG et des céramides

conduisant à l'inhibition de la glycolyse et/ou à l'activation de la protéine kinase C (*adapté de Joslin's Diabetes Mellitus, 14^{ème} édition, 2005*).

C) AGEs

Les AGEs sont des protéines ou des lipides qui subissent une glycosylation ou une glyco-oxydation non-enzymatique après contact avec l'aldose (Goldin et al., 2006; Schmidt et al., 1994). La formation d'AGEs (advanced glycosylation end products) est stimulée par l'hyperglycémie et le stress oxydatif (Nishikawa et al., 2000). Ces produits terminaux de glycation inhibent la phosphorylation de la tyrosine des IRS-1 et IRS-2 stimulée par l'insuline, menant à une altération de l'activité de la PI3K et de l'Akt (Miele et al., 2003). Les AGEs augmentent aussi la production des ROS et activent une voie de signalisation pro-inflammatoire menant à l'activation du NF- κ B (Hofmann et al., 1999). Il existe de nombreux exemples publiés sur la glycation des protéines et des mécanismes par lesquels ils peuvent avoir une incidence sur la sensibilité à l'insuline.

1.2.4.5.2. Lipotoxicité

Les FFA peuvent induire un défaut dans le transport du glucose stimulé par l'insuline (Boden and Chen, 1995; Dresner et al., 1999). S'il est démontré que les FFA peuvent directement altérer les voies de signalisation de l'insuline en stimulant la phosphorylation des sites sérine/thréonine de l'IRS-1 et -2, une hypothèse de plus en plus largement acceptée est que la RI hépatique et périphérique résulte de l'accumulation intracellulaire de divers métabolites impliqués dans la ré-estérification des FFA. Les FFA plasmatiques peuvent entrer facilement dans la cellule où ils sont, soit oxydés pour donner de l'énergie sous-forme d'ATP soit ré-estérifiés pour stockage sous-forme de TG. Par conséquent, il n'est pas étonnant qu'une augmentation des concentrations plasmatiques de FFA soit associée à une accumulation intracellulaire de TG (Boden et al., 2001). Pour des raisons encore peu connues, une augmentation des niveaux de FFA plasmatiques entraînent aussi une accumulation de nombreux métabolites impliqués dans la ré-estérification des FFA, tels les "long-chain fatty acyl-CoA" (LCFA-CoA) et le DAG (Itani et al., 2002) (Figure 4), un puissant activateur des isoformes classiques et nouvelles de la PKC. En plus de la PKC, plusieurs autres kinases à activité sérine/thréonine dépendante telles que l'IKK- β et la JNK peuvent aussi être activées par une augmentation aiguë du niveau de FFA plasmatique (Boden et al., 2005; Hotamisligil, 2005). Les mécanismes par lesquels les FFA activent ces kinases peuvent

comprendre la formation de ROS médiée par les FFA (Inoguchi et al., 2000), l'activation de la voie du TLR4 (Toll Like Receptor 4) (Shi et al., 2006) ou le stress du RE (réticulum endoplasmique) (Hotamisligil, 2005). Une fois activées, une ou plusieurs de ces kinases peuvent interrompre la signalisation de l'insuline en diminuant la phosphorylation de la tyrosine de l'IRS-1 et -2 (Yu et al., 2002). De là résultera une inhibition de l'activité de la voie de l'IRS/PI3 kinase/Akt qui contrôle la majorité des actions de l'insuline telles que la captation du glucose, la synthèse du glycogène, la glycogénolyse et la lipolyse (Saltiel and Kahn, 2001). Les FFA peuvent aussi interférer avec le transport du glucose stimulé par l'insuline en modulant la transcription génétique et la stabilité de l'ARNm du GLUT4 (Armoni et al., 2005; Long and Pekala, 1996).

Les céramides, des produits issus du métabolisme d'acides gras saturés à longue chaîne, inhibent pour leur part l'activation de l'Akt et la translocation des GLUT4 (Chavez et al., 2003). Les niveaux de céramides dans le muscle squelettique des sujets obèses sont augmentés (Adams et al., 2004) et la surexpression de céramidase, protège contre la RI induite par les FFA *in vitro* (Chavez et al., 2005).

1.2.4.5.3. Inflammation

Le diabète, l'obésité et d'autres troubles métaboliques chroniques sont associés à un état pro-inflammatoire caractérisé par une augmentation de marqueurs de l'inflammation dans la circulation ainsi que par une infiltration du tissu adipeux par des macrophages activés (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). L'inflammation induit une RI par l'action de divers médiateurs et l'activation de divers mécanismes (Wellen and Hotamisligil, 2005). La cytokine pro-inflammatoire dont l'implication dans la RI a été la plus largement étudiée est le TNF- α . Le TNF- α active une variété de sérine kinases, telles que la JNK, l'IKK β , et la kinase associée au récepteur de l'IL-1 (de Alvaro et al., 2004; Gao et al., 2003; Kim et al., 2005; Nguyen et al., 2005), qui augmentent directement ou indirectement la phosphorylation de la sérine des IRS-1 et -2, et par ce fait diminuent l'activité de la PI3 kinase et de l'Akt. Les cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α , l'IL-1 ou l'IL-6 induisent aussi les suppresseurs de protéines de signalisation de cytokines (SOCS) dont l'augmentation d'expression interfère avec l'interaction du récepteur à l'insuline avec l'IRS-1 et augmente de manière accrue la dégradation protéasomique de l'IRS-1 (Emanuelli et al., 2001). Outre les cytokines pro-inflammatoires, les

ROS et le stress du RE activent aussi la JNK et l'IKK β (Shoelson et al., 2006). Ces effets induisent une phosphorylation en sérine de l'IRS-1 et causent une RI.

1.2.5 Dysfonction, défaillance et mort de la cellule β pancréatique

Comme nous l'avons vu, l'hyperglycémie se développe lorsque la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques ne parvient pas à compenser la RI des tissus périphériques (Prentki and Nolan, 2006). Le développement du DT2 implique une détérioration progressive de la fonction (Kahn, 2001; Polonsky et al., 1996) et/ou la perte de masse (Butler et al., 2003) de la cellule β pancréatique (Figure 2).

La sécrétion d'insuline par les cellules β est régulée de manière précise par les changements de concentration plasmatique du glucose surtout mais aussi des autres nutriments calorigéniques tels que les FFA et acides aminés. La cellule β pancréatique est métaboliquement distincte de presque tous les autres types de cellules à plusieurs égards: (i) elle peut utiliser le glucose à des concentrations allant de 2 à 20 mmol/l, car elle exprime à la fois le GLUT2 et la glucokinase (hypothèse bien établie du moins chez les rongeurs); (ii) elle présente une faible activité de la lactate déshydrogénase et du transporteur monocarboxylate (transporteur membranaire du lactate/pyruvate) et par conséquent une forte activité de la navette mitochondriale malate-aspartate assurant ainsi l'oxydation mitochondriale du NADH et (iii) une forte activité à la fois de la pyruvate déshydrogénase et la pyruvate carboxylase (pas très bien établi chez l'humain), afin d'assurer la coexistence du métabolisme anaplérotique et oxydatif du glucose/pyruvate. Toutes ces adaptations métaboliques spécifiques visent à améliorer l'activité mitochondriale du cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative et la production efficace d'ATP. Une augmentation du ratio ATP/ADP mène à la fermeture des canaux potassiques sensible à l'ATP, à la dépolarisation de la membrane plasmique, à l'ouverture de canaux calciques membranaire sensible au potentiel électrique, à l'entrée massive du Ca^{2+} et enfin une fusion de granules contenant de l'insuline avec la membrane plasmique (Rutter, 2001). Les nutriments, les hormones ainsi que les neurotransmetteurs influencent la sécrétion d'insuline mais le régulateur le plus important est le glucose. En effet, une augmentation du métabolisme du glucose dans la cellule β , suite à la présence des niveaux élevés de glucose, mène à une élévation du ratio ATP/ADP. Cependant, le métabolisme des lipides, via la formation des acyl-CoA à longue chaînes et le cycle GL/FFA (Deeney et al., 2000; Haber et al., 2006; Nolan et al., 2006b) ou via le récepteur couplé à la

protéine G (GPR) 40 (Latour et al., 2007) peut aussi amplifier la sécrétion d'insuline. Les acides aminés peuvent aussi augmenter la sécrétion d'insuline, soit en modulant le métabolisme des lipides (Gaussin et al., 1996; Kowluru et al., 2001; Xiang et al., 2004), soit en dépolarisant directement la membrane plasmique mais seulement en présence du glucose (Brennan et al., 2002). Ces effets des nutriments sur la sécrétion d'insuline seront discutés plus en détails dans les parties suivantes.

Les effets bénéfiques des nutriments sur la sécrétion d'insuline sont renversés lorsque les cellules β sont exposées de façon chronique aux nutriments. En effet, une exposition chronique des cellules β à des concentrations élevées de glucose (glucotoxicité) et de FFA (lipotoxicité) seule ou combinées (glucolipotoxicité) altère la fonction et la survie de la cellule β pancréatique (El-Asaad et al., 2003; Hagman et al., 2005; Roduit et al., 2004; Weir et al., 2001).

1.2.5.1 Glucotoxicité

Unger et al. ont été les premiers à développer le concept de glucotoxicité (Unger and Grundy, 1985). Leurs travaux montrent qu'une sur-stimulation continue (exposition chronique) des cellules β par le glucose pouvait conduire à l'épuisement des réserves en insuline et donc d'une détérioration de la fonction, résultant en une aggravation de l'hyperglycémie. Par conséquent, l'incapacité à corriger l'hyperglycémie condamne la cellule β à une attaque perpétuelle des sucres, qui mène à la dysfonction et éventuellement la mort de la cellule β . La plupart des travaux ayant démontré l'effet du glucose chroniquement élevé sur la fonction des cellules β ont utilisé des lignées cellulaires β pancréatique. En utilisant une lignée cellulaire HIT-T15, Robertson et al. ont montré que l'expression du gène de l'insuline, le contenu cellulaire en insuline et la sécrétion d'insuline induite par le glucose sont progressivement compromis au cours du temps lorsque ces cellules étaient exposées à des concentrations élevées de glucose (Robertson et al., 1992). De plus, en lien avec ces données, d'autres observations ont révélé que des concentrations élevées de glucose étaient à l'origine de la détérioration de l'activité du promoteur de l'insuline ainsi que celle du complexe PDX-1 (pancreas-duodenum homeobox-1)/MafA (Olson et al., 1993; Olson et al., 1995; Sharma et al., 1995). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des îlots isolés de rats en culture pour une durée de 6 semaines (Briaud et al., 1999).

Il existe aussi des évidences que la glucotoxicité peut être liée au stress oxydatif. En effet, en plus de la glycolyse et le cycle de Krebs, d'autres voies peuvent être activées par le glucose menant à une production et une accumulation de ROS telles que l'auto-oxydation du glycéraldéhyde, la synthèse de DAG et l'activation des PKC (Figure 4) ainsi que le métabolisme du sorbitol (Poitout and Robertson, 2002). De plus, plusieurs études montrent que les cellules β ont des niveaux très bas d'enzymes antioxydantes comparés à d'autres tissus suggérant que la cellule β est particulièrement à risque de subir un stress oxydatif (Grankvist et al., 1981; Tiedge et al., 1997; Welsh et al., 1995). Cette hypothèse est soutenue par des études ayant démontré que la N-acétylcystéine et l'aminoguanidine, deux antioxydants, pouvaient protéger les cellules HIT-T15 et les îlots isolés de rat contre les effets néfastes des concentrations élevées de glucose (Kaneto et al., 1996; Tajiri et al., 1997). De plus, des études utilisant des rats ZDF (Zucker Diabetic Fatty rats) traités avec de la N-acétylcystéine et l'aminoguanidine ont rapporté une diminution des marqueurs du stress oxydatif et une amélioration de la tolérance au glucose (Briaud et al., 1999). Enfin, les travaux de Kaneto et al. (Kaneto et al., 1999) avec des souris *db/db*, montrent que le traitement avec la N-acétylcystéine était efficace pour stimuler la sécrétion d'insuline, améliorer la glycémie, réduire l'apoptose et augmenter la masse des cellules β .

1.2.5.2 Lipotoxicité

Unger et al. ont aussi été les premiers à développer le concept de lipotoxicité (Unger, 1995). Ils ont proposé l'hypothèse qu'une exposition des cellules β à des niveaux élevés de lipides (un mélange de palmitate et d'oléate) était une cause de la détérioration de leur fonction. Par conséquent, selon cette hypothèse, l'incapacité à corriger l'hyperlipidémie condamnerait la cellule β à une attaque perpétuelle de ces lipides, ce qui mènerait à la dysfonction et la mort des cellules β . En effet, plusieurs observations ont été rapportées à propos de la lipotoxicité et la cellule β , mais la plupart de ces études ont été faites avec des concentrations relativement élevées en glucose (11mmol/l) donc déjà potentiellement dangereuses. Cependant, quelques études *in vitro et ex vivo* (El-Assaad et al., 2010; Prentki et al., 1998) ont pu montrer que des niveaux élevés de lipides étaient relativement bénins aux cellules pancréatiques β , à condition qu'ils ne soient pas considérablement élevés et que le glucose n'est pas élevée simultanément. En fait, des données intéressantes indiquent que les niveaux élevés de FFA et l'hyperlipidémie pourraient être des signaux importants qui permettent l'adaptation des cellules β à la RI, comme en

témoigne le rat ZF (Zucker Fatty) obèse (Nolan et al., 2006a). Il est certainement possible que les îlots de Langerhans soient sensibles aux dommages lipotoxique à des niveaux normaux de glucose, mais cela arrive seulement en cas de défaut préexistant dans le processus de détoxification, tels qu'un problème dans le mécanisme d'oxydation des acides gras (Prentki and Nolan, 2006).

Les différents types d'acides gras ont des effets différents sur l'induction de l'apoptose des cellules β . Les acides gras saturés chroniquement élevés, tels que le palmitate et le stéarate induisent l'apoptose de la cellule β . En revanche, les acides gras mono-insaturés, tels que l'oléate et le palmitoléate, se sont révélés protéger la cellule β de l'apoptose (Cnop et al., 2001; El-Assaad et al., 2003). Le concept de lipotoxicité existe depuis plusieurs années, par contre des données manquent dans la littérature pour en démontrer son interférence sur le métabolisme. Par contre, plusieurs évidences émergentes montrent que les effets toxiques des lipides se manifestent seulement en présence des niveaux élevés de glucose (Poitout and Robertson, 2008; Prentki et al., 2013), il s'agit d'un nouveau concept appelé "glucolipotoxicité".

1.2.5.3 Glucolipotoxicité

Le terme "glucolipotoxicité" a été proposé en reconnaissance du fait que les effets toxiques des FFA sur les tissus apparaissent seulement en cas d'hyperglycémie (Prentki and Corkey, 1996; Prentki et al., 2002). Ceci s'explique par le fait qu'un niveau élevé de glucose, par l'intermédiaire de la voie AMPK/malonyl-CoA, empêche l'oxydation des acides gras et par conséquent la détoxification des acides gras, tout en même temps promouvant l'estérification des FFA menant à des complexes lipidiques, dont certains sont cytotoxiques (Figure 5) (Prentki and Corkey, 1996; Prentki et al., 2002). Par conséquent, il est probable que l'hyperglycémie soit une condition préalable pour qu'une lipotoxicité se produise; ce qui fait que le terme "glucolipotoxicité", plutôt que "lipotoxicité", soit le plus approprié pour décrire les effets délétères des lipides sur la fonction des cellules β . En accord avec cette hypothèse, El-Assaad et al., ont pu démontré qu'un effet synergique du taux élevé de glucose et d'acides gras saturés induisait l'apoptose des cellules INS832/13 et des îlots humains (El-Assaad et al., 2003; Fontes et al., 2009; Poitout, 2008; Poitout et al., 2010). Cette hypothèse est également soutenue par des données montrant que les rats ZDF hyperglycémiques développent une stéatose des îlots, tandis que les rats normoglycémiques ZF sont résistants à la stéatose. De plus, une autre étude chez les rats ZDF a

démontré que des antécédents d'hyperglycémie et non d'hyperlipidémie, conduisaient à une augmentation du contenu des TG dans les îlots et à une réduction de l'expression du gène de l'insuline (Harmon et al., 2001). Aussi une étude chez l'humain montrant une détérioration importante avec le temps de la réponse insulinaire aigue chez des sujets intolérants au glucose avec des niveaux élevés de FFA supporte aussi cette hypothèse (Stefan et al., 2003).

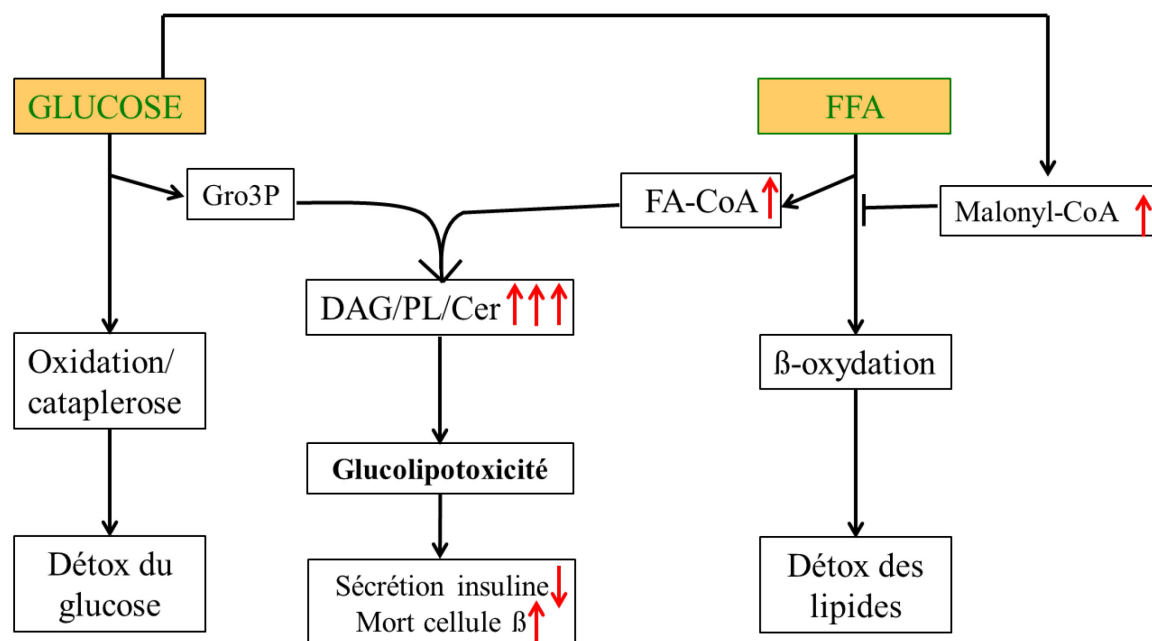


Figure 5. Mécanisme proposé de la glucolipotoxicité dans la cellule β pancréatique. Des niveaux élevés de glucose seul et de FFA seul, présents à court terme, ne sont pas délétères alors qu'une présence combinée de ces deux nutriments apporte une synergie fatale.

1.2.5.4 Inflammation

De nombreux processus (stress du RE, le stress oxydatif, le dépôt d'amyloïdes, la lipotoxicité et la glucotoxicité) peuvent induire une réponse inflammatoire, bien que certains d'entre eux peuvent aussi résulter de l'inflammation elle-même (Donath et al., 2008; Donath et al., 2003; Ehses et al., 2009; Hotamisligil and Erbay, 2008). La première évidence d'un processus inflammatoire dans les îlots pancréatiques a été obtenue par des données montrant que des niveaux élevés de glucose peuvent induire l'apoptose des cellules β (Donath et al., 1999). Des études qui ont suivi ont pu démontrer que des concentrations élevées de glucose induisaient le récepteur Fas (appartenant à la famille du récepteur du TNF, pouvant médier la mort cellulaire

par apoptose), qui à son tour se retrouve suractivé par la production du IL-1 β induite par le glucose (Maedler et al., 2002a; Maedler et al., 2002b; Maedler et al., 2001). Cet effet synergique du IL-1 β et des niveaux élevés de glucose sur la dysfonction de la cellule β a été observé aussi chez des îlots isolés de rats en culture (Fei et al., 2008). Il a été démontré dans une étude clinique qu'un antagoniste spécifique au récepteur du IL-1 β pouvait améliorer la fonction de la cellule β et atténuer grandement l'hyperglycémie chez des sujets diabétiques de type 2 (Herder and Donath, 2015). De plus, soutenant le fait que l'insulite dans le DT2 existe, un nombre élevé de cellules immunitaires a été observé dans les îlots de patients atteints de diabète de type 2, accompagné d'une augmentation des niveaux de cytokines et de chimiokines (Boni-Schnetzler et al., 2008; Ehses et al., 2007; Richardson et al., 2009).

1.2.5.5 Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site de synthèse et de repliage de protéines membranaires et sécrétées, et est responsable de plusieurs fonctions cellulaires importantes, y compris le stockage du Ca²⁺ et la synthèse des lipides. Dans la cellule β , le RE joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la maturation de l'insuline. Le RE abrite un environnement spécialisé, dans lequel on trouve des complexes de protéines chaperons et foldases. L'homéostasie du RE se définit comme étant l'équilibre entre la demande cellulaire en synthèse protéique et la capacité de repliement des protéines du RE pour promouvoir le transport et la maturation des protéines (Fonseca et al., 2011). Les cellules β subissent souvent des conditions qui provoquent une perturbation de l'homéostasie du RE. Par exemple, les fluctuations des niveaux de glucose dans le sang conduisent à une forte demande de biosynthèse de l'insuline, et par conséquent une augmentation à la fois de la transcription et la traduction de l'insuline (Melloul et al., 2002; Poitout et al., 2006). Il a été proposé que cette augmentation de la biosynthèse de la pro-insuline surcharge la lumière du RE de protéines dépliées et/ou mal repliées (Harding et al., 2001). Cette perturbation dans l'homéostasie et l'accumulation de la pro-insuline dépliée et mal repliée dans la lumière du RE cause un stress du RE (Scheuner et al., 2005).

Le stress du RE est régulé par trois protéines transmembranaires du RE : l'IRE1 (inositol requiring protein 1), la PERK (PKR-like kinase) et l'ATF6 (activating transcription factor 6). Une fois activés, ces détecteurs de stress sont à l'origine d'une cascade de signalisation entre le

RE et le noyau menant à un mécanisme cytoprotecteur appelé "UPR" (unfolded protein response) (Ron and Walter, 2007). Plusieurs études ont montré qu'une activation prolongée du IRE1 α due à une exposition chronique à des niveaux élevés de glucose mène à une dégradation de l'ARNm de l'insuline et à l'induction des effecteurs pro-apoptotiques tels que JNK et CHOP (C/EBP homologous protein) causant ainsi la dysfonction et la mort de la cellule β (Hou et al., 2008; Jonas et al., 2009; Lipson et al., 2006; Lipson et al., 2008). Tel que discuté précédemment, la glucotoxicité et la glucolipotoxicité sont associées à une augmentation de la production de ROS qui à leur tour peuvent aussi induire un stress du RE (Malhotra and Kaufman, 2007; Robertson et al., 2004; Robertson et al., 2003). Ainsi, une augmentation chronique du stress du RE peut jouer un rôle important dans la glucotoxicité et par conséquent à la progression du diabète. De manière intéressante, le TRB3 (tribbles homolog 3) semblerait être le lien entre la glucotoxicité et l'apoptose causée par le stress du RE. Le TRB3, connu pour son rôle dans l'inhibition de la voie Akt/PKB, est sur-régulé dans les îlots de rats Goto-Kakizaki, un modèle de rat hyperglycémique, et est impliqué dans l'apoptose induite par le stress du RE ainsi que la régulation négative de l'exocytose de l'insuline (Liew et al., 2010; Qian et al., 2008). PERK est très bien exprimé dans la cellule β et son activation régule négativement la biosynthèse de l'insuline. PERK joue un rôle important en atténuant la production protéique, et ceci s'avère protéger la cellule β contre l'apoptose induite par un stress du RE. En outre, il a été démontré que PERK sur-régule un effecteur anti-apoptotique, appelé AATF (antagonizing transcription factor) lequel est impliqué dans la survie de la cellule β à travers la régulation transcriptionnelle de AKT1 (Ishigaki et al., 2010). Le troisième détecteur de stress du RE, l'ATF6, joue un rôle protecteur et favorise la survie des cellules en augmentant la capacité de repliage de protéines du RE. Cependant, comme l'IRE1 et le PERK, l'ATF6 peut agir, via CHOP (son effecteur en aval), comme interrupteur dichotomique entre la survie et la mort. Dans la cellule β , une hyper-activation de l'ATF6 supprime l'expression du gène de l'insuline et cause la dysfonction et la mort de la cellule β (Seo et al., 2008). Le mécanisme exact de cette suppression du gène de l'insuline reste inconnu, ainsi que d'autres mécanismes impliquant l'UPR et ses régulateurs.

1.2.5.6 Dysfonction mitochondriale

La fonction mitochondriale dans la cellule β est régulée en partie par les niveaux et l'activité des protéines de découplage (UCP), en particulier UCP2, régulée elle-même par les ROS, lesquels

sont produit par l'activité de la chaîne de transport d'électrons (Prentki et al., 2013). Des quantités faibles de ROS sont nécessaires pour la sécrétion d'insuline, mais une production chronique et élevée de ROS peut avoir des effets délétères sur la fonction β pancréatique (Li et al., 2008; Simmons et al., 2005). Il est donc possible que l'activation de UCP2 protège la cellule β des effets délétères causés par un excès de ROS (Brand, 2005), en dissipant le gradient de protons et en diminuant la production de ROS, mais ceci est débattu. Il semble que UCP2 n'agit pas comme protéine découplante mais par un mécanisme qui reste à définir pour diminuer la production de ROS en réponse à divers stress dans la cellule β (Produit-Zengaffinen et al., 2007). Les niveaux et l'activité de UCP2 et le taux de production des ROS sont tous les 2 augmentés par une diète riche en gras et l'hyperphagie, éventuellement par le biais des FFA et leurs céramides (Koshkin et al., 2003). Ceci pourrait être lié à un phénomène de détoxification des ROS en excès par UCP2. Il est important de réaliser que la production des ROS peut avoir d'importantes fonctions de régulation sur le métabolisme intermédiaire, mais la cellule β a un système de défense limité contre l'excès de production de ROS puisque les niveaux d'expression d'enzymes antioxydantes dans la cellule β sont particulièrement faibles comparé à celles trouvées dans d'autres types cellulaires (Prentki, 1996). Par conséquent, les ROS pourraient contribuer à des phases précoces et tardives de dysfonction de la cellule β (Robertson, 2004). Tel que discuté plus haut, dans la cellule β , les mitochondries répondent à l'action du glucose extracellulaire en générant de l'ATP et en initiant une série d'événements menant à la libération de l'insuline. Il n'est donc pas surprenant que la mitochondrie de la cellule β soit devenue une cible importante pour les recherches sur l'étiologie du DT2. En effet notre équipe a montré que les cellules β de souris soumises à une diète riche en gras qui cause l'hyperglycémie ont des défauts de leur métabolisme énergétique, en particulier une hyperpolarization du potentiel de membrane mitochondrial associé à une réduction de la production d'ATP en réponse au glucose (Pepin et al., 2016; Peyot et al., 2010).

1.3 Métabolisme énergétique et diabète de type 2

Le maintien de l'homéostasie énergétique nécessite un équilibre entre la consommation et les dépenses d'énergie (Woods et al., 1998). Une prise alimentaire excessive peut faire basculer l'équilibre énergétique, ce qui provoque de l'obésité qui augmente à son tour le risque de développer le DT2, l'hyperlipidémie, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires. De

nombreux facteurs centraux et périphériques sont impliqués dans l'homéostasie énergétique, et la compréhension de ces mécanismes devrait conduire à des traitements efficaces pour le traitement de l'obésité et du DT2.

1.3.1 Métabolisme glucidique et lipidique dans le diabète de type 2

Jusqu'à 75% de l'utilisation du glucose insulino-dépendant se produit au niveau du muscle squelettique, tandis que le tissu adipeux compte pour seulement une petite fraction (Klip and Paquet, 1990). Malgré cela, les souris avec un knock-out du récepteur de l'insuline dans le muscle ont une tolérance au glucose normale (Bruning et al., 1998), tandis que ceux avec un knock-out du transporteur du glucose insulino-sensible au niveau du tissu adipeux ont une intolérance au glucose, apparemment en raison de la RI induite indirectement dans le muscle et le foie (Abel et al., 2001). Le métabolisme altéré du glucose et des graisses sans doute joue un rôle important dans l'étiologie de la RI de la dysfonction des cellules β et du DT2. La voie principale de l'utilisation du glucose est son oxydation via la glycolyse et le cycle de Krebs afin de produire de l'énergie. Cependant, un apport élevé de nutriments, en cas d'obésité ou de DT2 par exemple, mène à une production excessive de ROS dans la mitochondrie et à une surcharge du RE ce qui cause éventuellement un stress oxydatif et du RE. En outre, quand le cycle de Krebs est saturé un certain nombre de carbones du glucose empruntent d'autres voies métaboliques qui généreront à leur tour des métabolites tels que le lysophosphatidate, le DAG et les céramides, qui sont potentiellement toxiques pour diverses cellules une fois en excès (Nolan and Prentki, 2008; Poitout and Robertson, 2002).

1.3.2 Apport excessif de nutriments et diabète de type 2

L'apport excessif de nutriments calorigéniques est la principale cause du DT2, des maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique. Nous avons discuté plus haut le rôle de la "glucolipotoxicité" à l'origine de manifestations pathologiques causées par des apports excessifs en nutriments (El-Assaad et al., 2003; Prentki and Corkey, 1996; Ruderman and Prentki, 2004). Le DT2 associé à l'obésité se développe en raison d'un défaut de la cellule β du pancréas à sécréter suffisamment d'insuline en présence d'une résistance à l'insuline, une hyperlipidémie ou une demande accrue en insuline (Prentki et al., 2002), en raison de la réduction du contenu en insuline des cellules β (Delghingaro-Augusto et al., 2009; Leahy, 2005),

du stress oxydatif (Kaneto et al., 2007; Robertson, 2006), du stress du RE (Laybutt et al., 2007), de l'inflammation (Donath et al., 2003; Schernthaner and Schernthaner, 2005), et de la production excessive de céramides (Poitout and Robertson, 2008) et de divers produits issues de l'estérification des lipides (El-Assaad et al., 2010).

La dysfonction des cellules β du pancréas en raison d'un apport excessif en nutriments est, cependant, plus susceptible de se produire s'il y a des prédisposition génétique (Sladek et al., 2007) ou environnementale (Prentki and Nolan, 2006) sous-jacents. Par exemple, en comparant le rat ZF obèse et non diabétique avec le rat ZDF aussi obèse mais sujet au diabète, il a été observé que les deux animaux sont tout aussi hyperphagiques et résistants à l'insuline, mais que le rat ZDF avait un défaut au niveau du promoteur à l'insuline. Les rats ZDF seuls développent un diabète sévère (Griffen et al., 2001). Il est important de noter que le diabète observé chez les rats ZDF peut être évité par une restriction de la prise alimentaire (Ohneda et al., 1995) ou par l'exercice (Delghingaro-Augusto et al., 2012; Pold et al., 2005). De récentes recherches sur les facteurs génétiques du DT2 ont identifié plusieurs polymorphismes au niveau des gènes impliqués dans la croissance et la fonction des cellules β plutôt qu'au niveau des gènes liés à l'action de l'insuline (Frayling, 2007; Sladek et al., 2007). Nous pensons donc qu'un apport excessif de nutriments et les facteurs de susceptibilités sous-jacents au niveau de la cellule β sont les éléments clés impliqués dans le développement du DT2.

1.3.3 Anaplérose/cataplérose et cycles du pyruvate

L'oxydation de l'acétyl-CoA en dioxyde de carbone (CO_2) par le cycle de Krebs est un processus clé dans le métabolisme énergétique (Kornberg, 1966). Cependant, le cycle de Krebs joue également un rôle au niveau des voies de biosynthèse via lesquelles il participe à la conversion de ses intermédiaires principalement en glucose, en acides gras, ou en acides aminés non essentiels (Owen et al., 2002). Du moment où les anions du cycle de Krebs sont retirés du cycle ils doivent être remplacés pour permettre la poursuite de sa fonction. Ce processus est appelé "*anaplérose*". La pyruvate carboxylase (PC), qui génère l'oxaloacétate à partir du pyruvate dans la matrice mitochondriale, est la principale enzyme anaplérotique (Hasan et al., 2008). En revanche, si des intermédiaires métaboliques peuvent être ajoutés au cycle de Krebs, il est également important de les éliminer pour éviter l'accumulation d'anions dans la matrice mitochondriale. En effet, étant donné que le cycle de Krebs ne peut pas oxyder complètement

des composés à 4 ou 5 carbones, ces intermédiaires doivent alors être retirés du cycle et ce processus d'élimination est appelé "*cataplérose*" (Farfari et al., 2000). La régulation des voies anaplérotiques et cataplérotiques dépend de la situation métabolique et physiologique et du tissu ou organe spécifique impliqué. Dans la cellule pancréatique β , les voies d'anaplérose/cataplérose fournissent des facteurs de couplage métaboliques importants pour la sécrétion d'insuline, et l'activité de ces voies est augmentée dans les périodes de compensation de la RI dans les îlots (Prentki and Nolan, 2006). Des évidences indiquent que la perturbation de cette voie pourrait contribuer à l'altération de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG) dans le DT2. L'inhibition de la PC par l'acide phénylacétique inhibe la SIIG chez des îlots de rats ZL (Zucker lean) et ZF (Liu et al., 2002). De plus, l'exposition de cellules MIN6 à du palmitate a mené à une réduction de l'activité de la PC et était associée à une altération de la SIIG (Iizuka et al., 2002). Dans une étude semblable, l'exposition des cellules INS832/13 à des niveaux élevés de FFA (oléate et palmitate) a mené à une altération du cycle du pyruvate (Boucher et al., 2004). Dans cette dernière étude, l'ajout d'ester de malate (utilisé pour rétablir l'anaplérose) à des cellules INS832/13 et des îlots isolés de rats ZDF préalablement traités par des FFA a permis une récupération du moins partielle de la SIIG (Boucher et al., 2004). Contrairement aux études faites sur des lignées cellulaires, l'exposition d'îlots de rat à des niveaux élevés d'oléate cause une augmentation du cycle du pyruvate et stimule la sécrétion d'insuline basale ainsi que la SIIG (Liu et al., 1999). Il est donc possible que les FFA saturés (tel le palmitate) soient des inhibiteurs alors que les FFA monoinsaturés tel l'oléate activent les voies anaplérose/cataplérose. En outre, une amélioration de la SIIG suite à un traitement à l'insuline chez des rats Goto-Kakizaki était parallèle à une récupération de l'expression de la PC dans la cellule β (MacDonald et al., 1996a). Enfin, l'expression de la pyruvate carboxylase est réduite dans les îlots de rat diabétiques ZDF (MacDonald et al., 1996b) et dans les îlots humain de patients diabétiques de type 2 (MacDonald et al., 2009). Ainsi, il est possible que des défauts des flux métaboliques via les voies anaplérose/cataplérose de la cellule β , qui jouent un rôle dans la production de signaux mitochondriaux déclenchant la sécrétion d'insuline, soient impliqués dans le défaut de sécrétion d'insuline du pancréas endocrine qui caractérise le DT2.

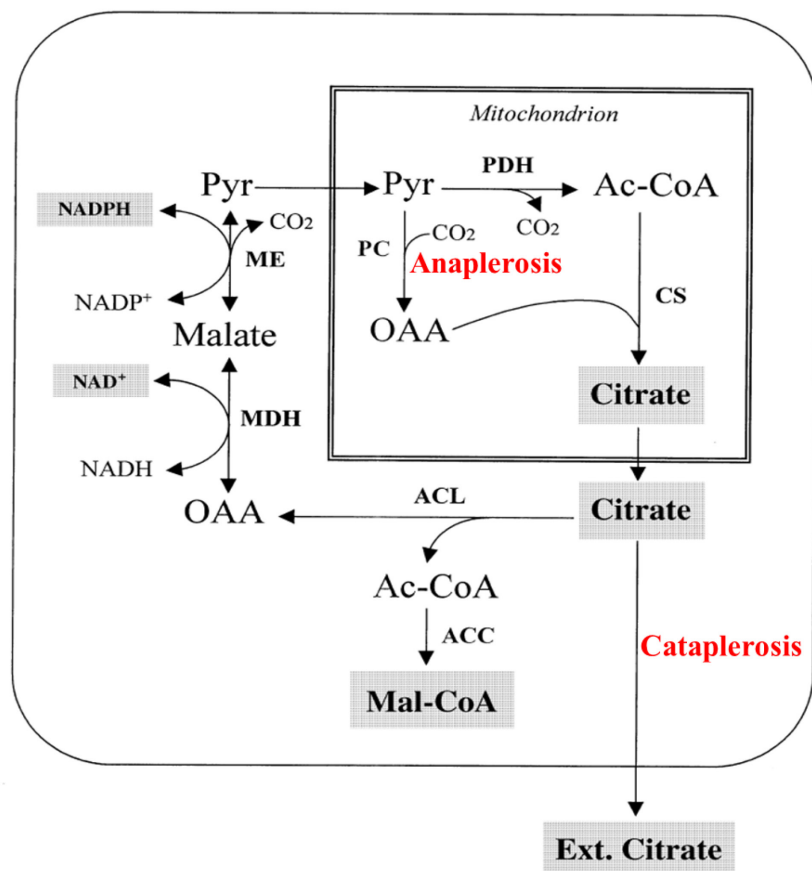


Figure 6. Les voies anaplérose/cataplérose et cycle du pyruvate. À des niveaux élevés de glucose, les cellules β forment une grande quantité de citrate dans les mitochondries via une voie anaplérotique (augmentation mitochondriale des intermédiaires du cycle du Krebs) impliquant la pyruvate carboxylase. Ce citrate peut alors sortir de la mitochondrie (cataplérose) vers le cytosol pour être transformé en acétyl-CoA et en OAA par l'ACL puis en malonyl-CoA par l'ACC. L'OAA est retransformé ultimement en pyruvate qui entre de nouveau dans la mitochondrie. Le citrate cytosolique va aussi échanger avec le malate provenant des navettes citrate/malate ou malate/aspartate. ACC, acétyl-CoA carboxylase; Ac-CoA, acétyl-CoA; ACL, ATPcitrate lyase; CS, citrate synthase; Ext., extra-cellulaire; Mal-CoA, malonyl-CoA; MDH, malate déshydrogénase; ME, enzyme malique; OAA, acide oxaloacétique; PC, pyruvate carboxylase, PDH, pyruvate déshydrogénase; Pyr, pyruvate. (*Adapté de Farfari et al., Diabetes 49:718–726, 2000*).

1.3.4 Le cycle glycérolipides/acides gras libres (GL/FFA)

Le métabolisme des lipides et celui du glucose sont liés à travers une voie centrale appelée "cycle glycérolipides/acides gras libres" également connu sous le nom de cycle "triglycérides/acides gras libres". Le cycle GL/FFA est initié en combinant le glycerol-3-phosphate (Gro3P) provenant du métabolisme du glucose avec des FFA sous-forme d'acyl-CoA. Le cycle GL/FFA est un processus d'estérification de FFA avec le glycérol pour former des TG, suivi de l'hydrolyse de ce dernier pour régénérer le glycérol et les FFA (Prentki and Madiraju, 2012). Ces FFA sont, dans la plupart des tissus, ré-estérifiés (Newsholme and Crabtree, 1976) (Figure 7). Ce processus est en effet futile puisque 7 molécules d'ATP sont consommées par chaque tour complet du cycle (Figure 8) libérant ainsi de la chaleur. Cette voie métabolique très active semble être un processus cellulaire essentiel pouvant jouer un rôle important dans diverses fonctions. Ces processus peuvent inclure la stimulation des cellules par le glucose et les FFA pour promouvoir leur croissance et moduler l'expression des gènes, la détoxification des nutriments en excès et la régulation de la sécrétion d'insuline. Ceci est discuté plus en détail dans les paragraphes suivants.

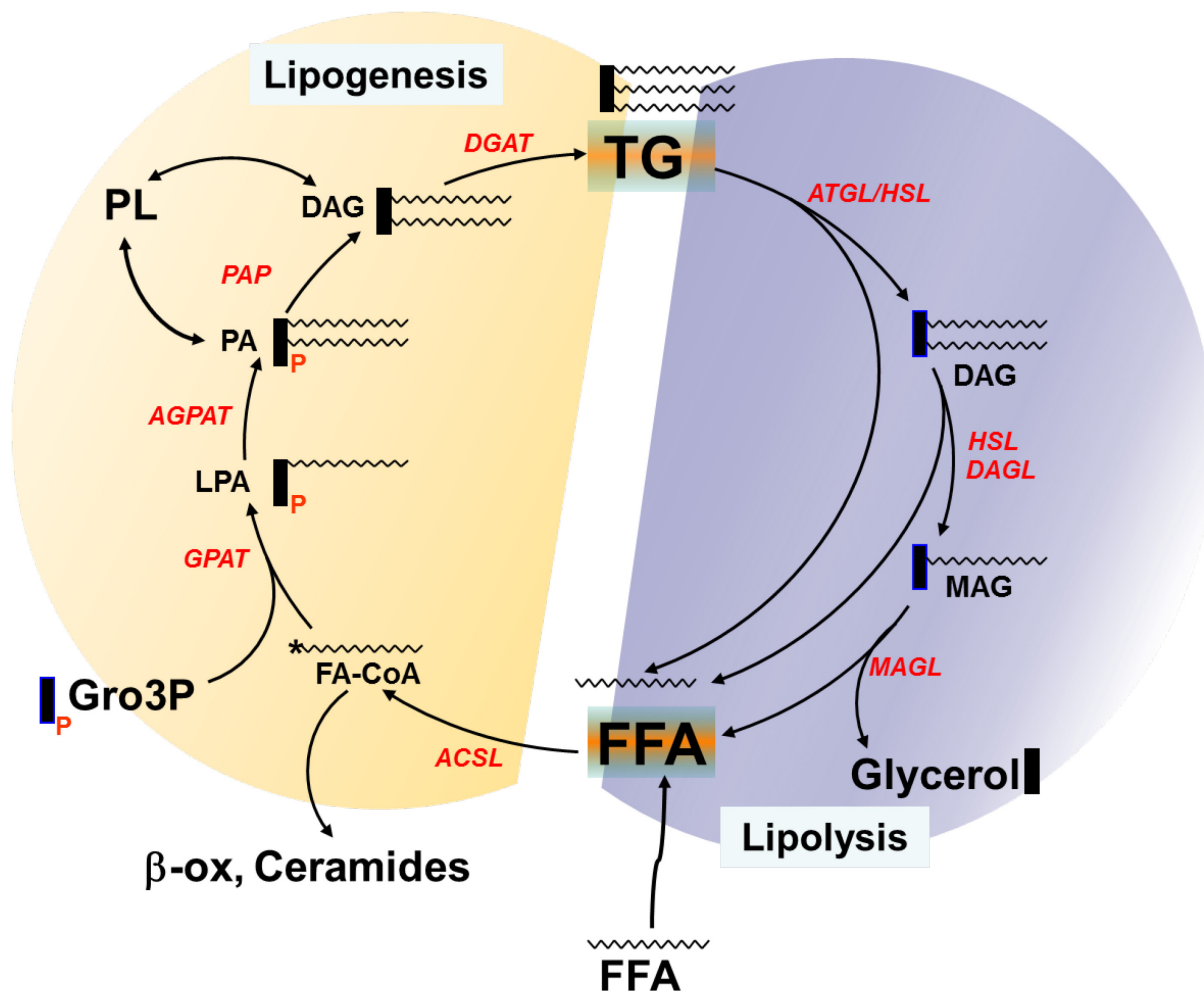


Figure 7. Description du cycle glycérolipides/acides gras libres. Une description détaillée de ce cycle est présente dans le texte. Le cycle GL/FFA est composé de deux segments : un segment lipogénique (en jaune) et un segment lipolitique (en mauve). ACSL, synthétase des acyl-CoA à longue chaîne; GPAT, glycérol-3-phosphate acyl transférase; AGPAT, 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases; PAP, acide phosphatidique phosphatase; DAGT, diacylglycérol acyl transférase; ATGL, triglycéride lipase de l'adipocyte; HSL, lipase hormono-sensible; DAGL, diacylglycérol lipase; MAGL, monoacylglycérol lipase (*Prentki & Madiraju Endocrine Rev 2008*).

1.3.4.1 Lipogénèse, lipolyse et enzymes associées

Le segment lipogénique du cycle GL/FFA est initié par une enzyme appelée GPAT (glycerol-3-phosphate acyl transférase) qui permet la synthèse du LPA (lysophosphatidic acid) à partir de

FFA sous forme d'acyl-CoA (FA-CoA) et du G3P. Le GPAT est une protéine membranaire à 4 isoformes, 2 au niveau des mitochondries (GPAT-1 et 2) (Coleman, 2007) et 2 autres au niveau du RE (GPAT-3 et 4) (Takeuchi and Reue, 2009). Les GPAT 3 et 4 comptent pour 80-90% de l'activité totale dans la majorité des tissus (Wendel et al., 2009). Notre laboratoire a récemment démontré que la surexpression de la GPAT 3 dans les cellules INS832/13 augmente la teneur en TG et DAG et augmente l'effet toxique de la glucolipotoxicité (El-Assaad et al., 2010). L'étape suivante de la lipogenèse est la formation du PA (phosphatidic acid) à partir du LPA, catalysée par l'AGPAT (1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase) qui est aussi une enzyme membranaire, présente sous plusieurs isoformes, dont la plupart sont situés dans le RE (Agarwal et al., 2006; Hollenback et al., 2006; Takeuchi and Reue, 2009). Le PA peut également être formée par d'autres voies alternatives, y compris la phosphorylation de DAG par la DAG kinase, et l'action de la phospholipase D sur les phospholipides membranaires (Topham, 2006). L'hydrolyse du PA en DAG est catalysée par les lipases, situées dans le cytosol, le RE et le noyau. La localisation cellulaire des lipins dépend du type cellulaire, du contexte métabolique et des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, (Bou Khalil et al., 2010). La dernière étape de la lipogenèse est la synthèse du TG à partir du DAG, catalysée par une DGAT (DAG acyltransferase)-1 et 2 (Yu and Ginsberg, 2004). Ces deux enzymes sont présentes dans le RE et dans les gouttelettes lipidiques.

Le segment lipolytique du cycle GL/FFA est initié par l'hydrolyse des TG, stocké dans la plupart du temps dans les gouttelettes lipidiques, et préférentiellement par l'ATGL (adipose triglyceride lipase), produisant ainsi du DAG. Il a été suggéré que l'ATGL pouvait montrer des préférences pour la position *sn*-2 pendant l'hydrolyse des TG, libérant ainsi du *sn* 1,3-DAG à partir des TG (Lass et al., 2011). La HSL (hormone sensitive lipase) hydrolyse le DAG, générant ainsi le monoacylglycérol (MAG) (Mairal et al., 2006; Zechner et al., 2005). Outre la HSL, le DAG peut également être hydrolysé par les *sn*1-DAG lipases α et β localisées au niveau de la membrane plasmique (Bisogno et al., 2003). Les deux enzymes ont leur domaine catalytique orientée vers le côté cytosolique (Bisogno et al., 2003). La HSL et la DAG lipase génèrent le MAG, qui dans la plupart des tissus est hydrolysé par une MAG lipase pour produire du glycérol et des FFA, les deux produits finaux de la lipolyse. Des études récentes indiquent que MAG peut également être hydrolysé par deux enzymes liées à la membrane plasmique appelées ABHD6 (α/β -domain

containing hydrolase-6) et ABHD12, dont les sites actifs sont orientés vers l'intérieur et l'extérieur de la cellule, respectivement (Blankman et al., 2007).

1.3.4.2 Métabolites générés par le cycle GL/FFA

Un aspect particulièrement intéressant du cycle GL/FFA, est qu'il est susceptible de fournir un lien crucial entre l'homéostasie énergétique intracellulaire et la modulation d'une multitude de processus de signalisation cellulaire (Prentki and Madiraju, 2008). Excepté les TG, presque tous les autres métabolites générés par le cycle GL/FFA sont considérés comme étant des molécules de signalisation lipidiques. L'ampleur de l'efficacité de ces métabolites pour une voie métabolique donnée devrait dépendre du contexte de leur génération, localisation (par exemple : le cytosol, la membrane plasmique), et en outre leur métabolisme.

Le processus d'estérification au niveau du cycle GL/FFA produit en premier lieu du LPA et du PA, très bien connus comme étant des molécules de signalisation lipidiques. Le LPA active les récepteurs couplés aux protéines G (GPR), le Edg2/LPA-R et le P2Y9/GPR23 (Kostenis, 2004; Noguchi et al., 2003). En outre, il a été suggéré que l'activation des récepteurs LPA pouvait augmenter l'activité du NFκB via les protéines adaptatrices Bcl10 et Malt-1 (Klemm et al., 2007). Le PA, quant à lui, active directement mTOR (mammalian target of rapamycin) (Fang et al., 2001; Foster, 2007). L'activation de mTOR par le PA est susceptible d'avoir des conséquences physiologiques importantes puisque mTOR est un détecteur du stress cellulaire et de l'équilibre nutritionnel (Tsang et al., 2007). Le PA peut être produit par différents mécanismes, y compris l'acylation du LPA, la phosphorylation du DAG, et l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la phospholipase-D (Foster, 2007). L'activation de mTOR est essentielle pour la survie cellulaire. En particulier, les cellules à croissance rapide, telles que des cellules cancéreuses, dépendent beaucoup des mTOR activés, et ces cellules entrent en apoptose si la synthèse de PA est inhibée (Foster, 2007). Donc, le PA semble jouer un rôle clé dans la réponse cellulaire à un stress nutritionnel.

Les FFA, un des produits finaux de la lipolyse, peuvent aussi participer à diverses voies, y compris la stimulation des GPRs 40 et 120 (Covington et al., 2006; Nolan et al., 2006b; Poitout, 2003), des protéines découplantes (Sluse et al., 2006), et des PPARs (Duplus et al., 2000). Les FA-CoA, la forme activée des FFA, module l'activité d'une multitude d'enzymes et de canaux

ioniques, et elle est aussi impliquée dans le contrôle transcriptionnel des gènes codant pour les protéines péroxisomales (Black et al., 2000; Faergeman and Knudsen, 1997).

Un des plus importants métabolites du cycle GL/FFA est le *sn*1,2-DAG, qui participe à plusieurs voies de signalisation. Le DAG contenant l'acide arachidonique comme FFA, produite à la surface interne de la membrane plasmique au cours de l'hydrolyse du phosphoinositide suite à la signalisation des récepteurs membranaires, est impliqué dans l'activation des enzymes PKC (Becker and Hannun, 2005; Biden et al., 1992; Prentki and Matschinsky, 1987). Les PKC sont activées par la *sn*1,2-DAG mais pas par les isomères *sn*1,3- ou *sn*2,3-DAG (Boni and Rando, 1985; Goni and Alonso, 1999). Outre l'activation de la PKC, DAG est également impliqué dans l'expression de l'hypoxie-inducible factor (HIF). Il est important de noter que le DAG produit par l'hydrolyse des TG est largement associé aux gouttelettes lipidiques, et que le DAG provenant de l'hydrolyse des phospholipides est susceptible d'être au niveau de la membrane plasmique, tandis que le DAG *de novo* synthétisé à partir de l'hydrolyse du PA est susceptible d'être associé au RE ou séquestré au sein du RE. Ainsi, selon le site de production, le DAG peut déclencher différentes cascades de signalisation.

Une autre molécule de signalisation dérivée du cycle GL/FFA est le MAG. Par exemple, le 2-AG (2-arachidonylglycerol) joue un rôle dans la régulation de plusieurs voies métaboliques incluant la lipogenèse et le contrôle de l'appétit (Lichtman and Cravatt, 2005; Matias et al., 2006; Osei-Hyiaman et al., 2005). De plus, de manière très intéressante, notre laboratoire a découvert récemment que c'est plutôt le MAG, et non le DAG, qui est un facteur de couplage métabolique pour la SIIG issue de la lipolyse (Zhao et al., 2014). Ceci sera discuté plus en détail dans les paragraphes suivants. Outre cet effet du MAG sur la sécrétion d'insuline, nous avons aussi des évidences suggérant que le MAG est impliqué dans le brunissement du tissu adipeux via PPAR α et PPAR γ (Zhao et al., 2016).

Enfin, une possibilité attirante en termes de son implication thérapeutique est que le cycle GL/FFA soit lié au contrôle de l'état énergétique de la cellule, en particulier le ratio AMP/ATP cytosolique et la modulation de l'activité de l'AMP-kinase (AMPK) (Gauthier et al., 2008; Ghosh et al., 1991). Cela provient du fait que plus le cycle fonctionne, plus il produit de l'AMP car la réaction de la FA-CoA synthase utilise un ATP pour libérer un AMP, un pyrophosphate (PPi), et de la chaleur (Figure 8) (Prentki and Madiraju, 2008).

Étant donné que la production du Gro3P dérivé du glucose (la partie glycérol impliquée dans la synthèse des GL) est associée à la réaction de la GPDH (Gro3P deshydrogenase) cytosolique et par conséquent, la réoxydation du NAD réduit (NADH), le GL/FFA est peut-être aussi impliqué dans le contrôle du potentiel redox cytoplasmique et le flux glycolytique. Ces deux dernières parties seront discutées plus en détail dans les paragraphes suivants.

1.3.4.3 Rôle du cycle GL/FFA dans le diabète de type 2

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la défaillance de la cellule pancréatique β dans le DT2 (*voir section 1.2.3*). Conformément à l'idée qu'une altération du cycle GL/FFA est impliquée dans la défaillance de la cellule β , des souris transgéniques ayant reçu une alimentation riche en gras et surexprimant la HSL spécifiquement dans la cellule β , montrent une stimulation de la lipolyse et une réduction de la teneur en TG des îlots de Langerhans, en association avec une intolérance au glucose et une SIIG sévèrement altérée (Winzell et al., 2003). Ainsi, il est important de noter qu'une altération du cycle GL/FFA, soit en abaissant le segment lipolytique par un HSL-KO (Peyot et al., 2004; Roduit et al., 2001) ou en le stimulant via la surexpression du HSL (Winzell et al., 2003), peut conduire à une diminution de la SIIG chez la cellule β . De même, de nombreuses études de notre laboratoire dans divers modèles de rongeur avec intolérance au glucose, DT2 avec un défaut de SIIG, comprenant les souris DIO (Peyot et al., 2010), les rats ZF avec une pancréatectomie partielle (Delghingaro-Augusto et al., 2009), les rats ZDF à 9 semaines au moment de la transition pré-diabète à diabète et enfin les rats ZDF diabétiques à 12 semaines (Tiano et al., 2011), ont montré une altération du cycle GL/FFA dans les îlots de ces animaux (Prentki and Madiraju, 2012).

En revanche, des évidences indiquent qu'une stimulation du cycle GL/FFA est impliquée dans le processus de compensation de la cellule β . En effet, les travaux de notre laboratoire montrent que chez des îlots de rats ZF, un modèle de compensation des cellules β , une augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et le palmitate corrèle bien avec l'augmentation du processus d'estérification des FFA, la stimulation de l'oxydation des acides gras, la lipolyse et l'expression d'enzymes lipolytiques (Nolan et al., 2006a).

Il est bien connu qu'une accumulation de TG, DAG et de malonyl-CoA dans le muscle ainsi qu'une diminution de l'oxydation des acides gras contribuent au développement de la RI chez des sujets obèses et diabétiques de type 2 (Bastie et al., 2004; Ruderman and Prentki, 2004;

Shulman, 2000). Cependant, si l'activité du cycle GL/FFA est élevée dans le muscle, ceci pourrait contribuer à restaurer la sensibilité à l'insuline (Bastie et al., 2004; Bonen et al., 2006). Il a été suggéré que l'action antidiabétique des thiazolidinediones (TZDs) pouvait être principalement liée à l'amélioration de l'estérification des FFA et l'accumulation de TG dans le tissu adipeux, ce qui permet de rediriger une grande partie du gras périphérique vers cet organe (Sharma and Staels, 2007). Toutefois, leur action antidiabétique pourrait aussi être due à d'autres effets, tels que l'activation de l'AMPK (Ruderman and Prentki, 2004) et l'activation du cycle GL/FFA (Guan et al., 2002). La glycérol kinase (GlyK) présente une très faible activité chez les adipocytes et ne peut donc réutiliser le glycérol issu de la lipolyse (Guan et al., 2002). Cependant, suite au traitement à la Rosiglitazone, laquelle induit la GlyK adipocytaire (Guan et al., 2002), le glycérol libéré par la lipolyse peut être re-phosphorylé pour être ré-utilisé pour l'estérification des FFA ce qui active le cycle GL/FFA et mène à une baisse de FFA circulant, causant la RI (Leroyer et al., 2006). Une étude de notre groupe a montré que le tissu adipeux sous-cutané de patients obèses et résistants à l'insuline ont une expression augmentée et coordonnées des gènes de la lipogénèse et lipolyse en comparaison aux patients obèses et sensibles à l'insuline, ce qui suggère un cycle GL/FFA augmenté dans le groupe avec RI (Gauthier et al., 2014). En conclusion, un cycle GL/FFA activé pourrait contribuer à maintenir une normoglycémie chez des individus obèses en potentialisant la sécrétion d'insuline et en prévenant la RI, et en restaurant la sensibilité à l'insuline ou en prévenant son aggravation chez des individus obèses avec une RI.

1.4. Détoxification des nutriments en excès

1.4.1 Généralités

Notre laboratoire a proposé que la glucolipotoxicité serait en partie à l'origine des manifestations pathologiques du DT2 suite aux apports excessifs et chroniques de nutriments (El-Assaad et al., 2003; Prentki and Corkey, 1996; Ruderman and Prentki, 2004). Contrairement à d'autres types cellulaires, la cellule β , pour adapter sa sécrétion d'insuline aux niveaux des nutriments circulants, doit permettre l'entrée et métaboliser de grandes quantités de ces nutriments. Les nutriments calorigéniques activent de nombreuses voies métaboliques en même temps et génèrent une multitude d'intermédiaires métaboliques et leurs dérivés dont certains peuvent être très toxiques (El Assaad et al. 2004). Afin de faire face à des niveaux toxiques de

nutriments et/ou de leurs intermédiaires, les cellules disposent de multiples voies de détoxification qui ont pour fonction de modifier les molécules potentiellement toxiques et/ou de les excréter à l'extérieur des cellules. L'importance relative de ces différentes voies de détoxification des nutriments en excès et les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas bien compris quelle que soit la cellule ou le tissu. Nous avons dès lors établi un nouveau concept appelé « glucolipodétoxification ».

1.4.2. Le concept de glucolipodétoxification

La Glucolipotoxicité représente actuellement un concept populaire qui désigne les influences indésirables ou toxiques pour la fonction et/ou la survie de la cellule β pancréatique et d'autres tissus, causée par l'exposition chronique à des niveaux élevés de glucose et de lipides (Prentki and Corkey, 1996; Ricci et al., 2008; Unger, 1995; Unger and Grundy, 1985). Il est surprenant que, bien que les mécanismes de détoxification de différents xénobiotiques et de médicaments soient bien étudiés, peu d'information est disponible concernant la détoxification des nutriments en excès, d'où le nouveau concept de glucolipodétoxification qui fait l'objet d'une partie de cette thèse. Des niveaux intracellulaires élevés de certains métabolites, comme le cholestérol libre, les FFA etc., sont toxiques pour les cellules. Ces derniers sont rendus moins toxiques par leur conversion en esters de cholestérol ou en TG et stockées sous forme de gouttelettes lipidiques ou exportées hors des cellules. En présence des niveaux élevés de glucose, ~15% des carbones du glucose incorporés dans les lipides des cellules β se trouve dans les esters de cholestérol, alors que 70% sont dirigés vers les glycérolipides (MacDonald et al., 2008). La stimulation du cycle GL/FFA observé dans les îlots de rats ZF obèses, qui compensent la résistance à l'insuline, pourrait prévenir en partie du moins la toxicité causée par des niveaux élevés de lipides et glucose circulants et contribuer également à prévenir l'accumulation des TG dans les îlots (Nolan et al., 2006a; Nolan et al., 2006b). En ce qui a trait à l'excès de cholestérol sa sortie de la cellule β semble être important pour la fonction β -pancréatique. En effet, la suppression de l'ABCA1 (ATP-binding cassette transporter-A1) qui permet la sortie du cholestérol des cellules β , cause son accumulation, diminue la sécrétion d'insuline et altère l'homéostasie du glucose chez la souris (Brunham et al., 2008).

1.4.3. Le cycle GL/FFA et la détoxification des nutriments calorigéniques

En plus de son rôle dans la sécrétion d'insuline, le cycle GL/FFA pourrait être impliqué dans des mécanismes cellulaires de détoxification des nutriments calorigéniques en excès pour plusieurs raisons (Figure 8).

- (i) Il pourrait être à l'origine d'une glucodétoxification, par exemple dans la cellule β pancréatique, en dirigeant les carbones du glucose vers le glycérol. Ce dernier peut quitter facilement la cellule en raison de la présence des transporteurs aquaglycéroporins, et de la faible expression de la glycérokinase dans la cellule β (MacDonald and Marshall, 2000; Noel et al., 1997) qui permet la réincorporation du glycérol dans le cycle.
- (ii) Il permet une lipodétoxification via la libération des FFA provenant de l'hydrolyse des TG, qui peuvent être soit éliminés hors de la cellule soit oxydés dans les mitochondries (Martins et al., 2004).
- (iii) Le cycle GL/FFA est un processus nécessitant de l'énergie et sa stimulation cause une augmentation de l'oxydation de nutriments, tels le glucose et les FFA, empêchant ainsi une surcharge énergétique causée par un éventuel apport excessif de nutriments.
- (iv) Enfin, une stimulation continue du cycle GL/FFA, via la production élevée d'AMP faisant suite à l'action de la LC-acyl-CoA (long chain-acyl-CoA) synthase, peut provoquer l'activation de l'AMPK (Gauthier et al., 2008; Prentki and Madiraju, 2008), ce qui réduit le stockage de nutriments dans les tissus non-adipeux et favorise ainsi la détoxification des nutriments (Steinberg et al., 2006).

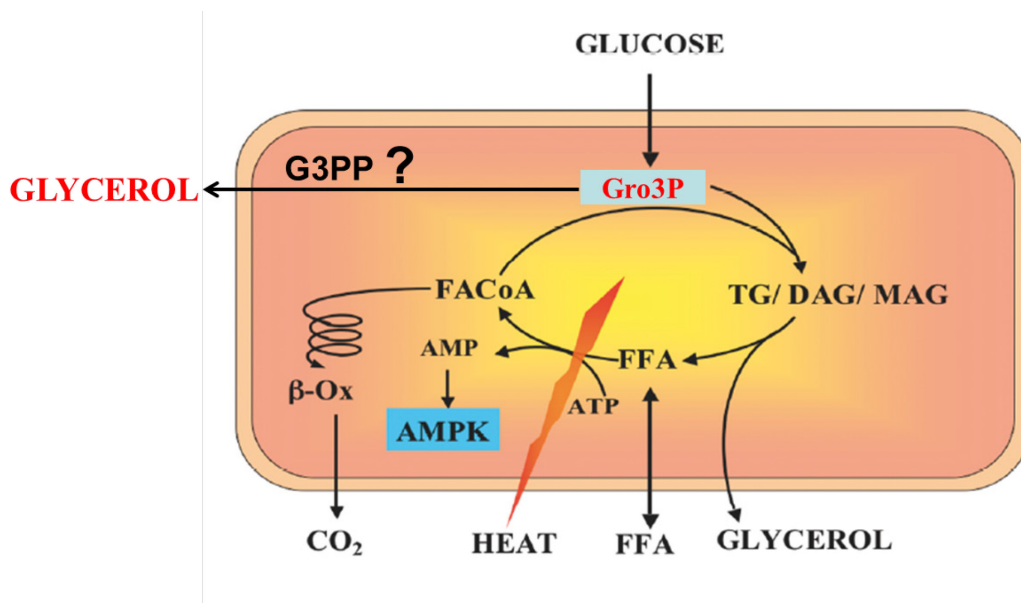


Figure 8. Rôle du cycle GL/FFA dans la détoxification des nutriments calorigéniques. Une augmentation des niveaux du glucose mène à une provision du glycérol-3-phosphate (Gro3P) nécessaire pour la synthèse des glycérolipides (TG, DAG, MAG) et à l'activation de la lipolyse du moins dans certains tissus tels que la cellule β . Ce cycle permet une détoxification des lipides via la lipolyse et la β -oxydation et la libération extracellulaire des FFA et du glycérol. Il permet aussi la détoxification du glucose (en plus de l'hydrolyse directe du Gro3P par la PGP/G3PP) via la conversion direct des carbones du glucose en glycérol qui est libéré par la plupart des tissus n'exprimant pas la glycérokinase. Le cycle GL/FFA permet une détoxification des nutriments en excès d'une manière générale car il s'agit d'un cycle futile consommant de l'énergie et produit de la chaleur et du CO_2 à partir des nutriments calorigéniques. Une consommation élevée d'ATP par ce cycle mènera à une augmentation de la synthèse d'AMP suivie d'une activation d'AMPK, qui une fois activée, stimule l'oxydation du glucose et des acides gras (*Adapté de Marc Prentki and S. R. Murthy Madiraju, Endocrine Reviews 29: 647–676, 2008*).

1.4.3.1. Production et exportation du glycérol

La détoxification du glucose sous forme de glycérol implique l'exportation du glycérol à l'extérieur de la cellule, menée par au moins 3 aquaglycéroporines membranaires (AQP-3, 7, 9) selon les tissus. L'AQP-7 est responsable de l'efflux du glycérol principalement dans les

adipocytes (Hara-Chikuma et al., 2005; Hibuse et al., 2005) alors que l'AQP-9 l'est dans les hépatocytes et la cellule β pancréatique. L'AQP-3 est, quant à elle, présente dans la majorité des tissus. La suppression de l'AQP-7 dans le tissu adipeux altère le cycle GL/FFA menant à une augmentation de la quantité de FFA intracellulaires, l'obésité et la RI (Fruhbeck, 2005; MacDougald and Burant, 2005). Les souris avec une délétion totale de l'AQP-7 ont une réduction de la masse des cellules β et du contenu en insuline en association avec des niveaux élevés de glycérol et de TG dans les îlots pancréatiques. Cet effet est accompagné d'une augmentation de l'activité de la glycérokinase des cellules β pancréatiques (Matsumura et al., 2007). Ainsi, cette étude suggère que les processus entourant la production de glycérol par le cycle GL/FFA et sa sortie via les AQP, participent à la régulation de la masse et la fonction des cellules β . Un autre avantage à considérer, est que la production du glycérol à partir du glucose consomme de l'ATP et du NADH, ce qui stimule la lipolyse et le cycle GL/FFA contribuant ainsi au maintien d'un niveau d'énergie normale face à l'apport excessif de nutriments. De plus, ceci mène à une diminution de la pression redox sur la chaîne de transport d'électrons, réduisant ainsi la production de ROS et la dysfonction mitochondriale (Ray et al., 2012). Le glycérol est une importante destination des carbones du glucose dans la cellule β (Lorenz et al., 2013; Peyot et al., 2010), et pourrait être impliqué dans le processus de glucolipodétoxication comme examiné dans cette thèse.

1.4.3.2 Exportation des FFA

En plus de la conversion de carbones du glucose en glycérol suivie par son excrétion hors de la cellule, la glucodétoxication peut également avoir lieu via la synthèse *de novo* des FFA suivi de leur exportation en dehors de la cellule (Figure 8). Dans la plupart des cellules dont les cellules β , les carbones du glucose peuvent être dirigés vers la biosynthèse des FFA et ce mécanisme est accéléré avec l'augmentation des concentrations du glucose (Fruhbeck, 2005). La libération des FFA de la cellule associée à leur synthèse *de novo* seraient un mécanisme efficace pour la glucodétoxication puisque la synthèse du palmitate implique l'utilisation de 16 atomes de carbones provenant du métabolisme du glucose. De plus, ce mécanisme utilise beaucoup d'ATP et d'équivalents réduits (ex NADPH) ce qui réduit la pression sur la chaîne de transport d'électrons. Le transport des FFA à travers la membrane plasmique peut être dû à une simple diffusion ou à un transport facilité (Abumrad et al., 1998; Hamilton and Kamp, 1999; Prentki and

Madiraju, 2008). Bien que l'entrée des FFA dans les cellules ait été largement étudiée, le mécanisme de leur sortie est quant à lui quasi inconnu. Plusieurs données montrent que le transporteur d'acide gras (FAT)/CD36, des protéines de liaison d'acides gras et des protéines de transport d'acides gras sont impliqués dans l'absorption des FFA et donc possiblement dans leur libération des cellules (Abumrad et al., 1998; Carley and Kleinfeld, 2011; Hamilton and Kamp, 1999; Prentki and Madiraju, 2008).

1.4.3.3. Cycle futile et AMP-Kinase

La biosynthèse du malonyl-CoA et la lipogénèse *de novo*, via la glycolyse et l'anaplérose, est contrôlée par l'AMPK laquelle est activée par une augmentation du ratio AMP/ATP. Le cycle GL/FFA a besoin d'un approvisionnement continu en FA-CoA, donc les conditions l'accéléralent pourraient effectivement causer l'activation de l'AMPK par l'intermédiaire du taux d'AMP élevés car la réaction de l'acyl-CoA synthase produit de l'AMP (Kawaguchi et al., 2002). Ainsi, une fois activée par une augmentation du flux à travers ce cycle, l'AMPK pourrait contribuer à réduire le stockage de nutriments, favoriser leur oxydation et ainsi leur détoxification (Steinberg et al., 2006). Le rôle de l'AMPK dans la détoxification des nutriments a été mis en évidence dans des études sur des rats ZDF et des souris *ob/ob*. Le traitement de ces animaux avec un activateur de l'AMPK appelé AICAR (Le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide) conduit à une diminution de l'accumulation ectopique de lipides et prévient le diabète (Yu et al., 2004). Il est important de souligner que le concept de «glucolipodétoxification» associé au cycle GL/FFA, un mécanisme qui a été proposé à l'origine dans la cellule pancréatique β (Prentki and Nolan, 2006), est aussi applicable à d'autres tissus et pourrait donc jouer un rôle essentiel dans la prévention de la toxicité due à un apport excessif de nutriments dans tout l'organisme.

1.5 Sécrétion d'insuline

Le principal rôle de la cellule pancréatique β est de sécréter de l'insuline en fonction des niveaux de nutriments dans le sang (principalement le glucose) et contrôler ainsi la glycémie. La sécrétion d'insuline est un processus complexe mais très bien contrôlé.

1.5.1 Biosynthèse, transport intracellulaire et exocytose de l'insuline

Le produit initial de la traduction des ARNm de l'insuline est la pré-pro-insuline; les 25 premiers acides aminés de la molécule représentent une séquence riche en résidus hydrosolubles qui permettent la pénétration rapide du peptide en cours de synthèse dans le RE rugueux (RER). Dès que ce polypeptide passe dans le RER, il est coupé en pro-insuline par des peptidases spécifiques. La pro-insuline quitte ensuite le RER stockée dans des microvésicules et rejoint l'appareil de Golgi. Elle est alors spécifiquement reconnue par un récepteur Golgien et est dirigée vers des vésicules de type dit "contrôlé", c'est à dire libérées seulement en réponse à un signal. Elle quitte donc l'appareil de Golgi dans des vésicules, revêtues de clathrine; ces vésicules subissent une acidification de leur contenu et la pro-insuline est clivée en insuline et peptide C par des enzymes de conversion ayant des activités trypsinique et carboxypeptidasique B; au même moment, le granule perd son revêtement de clathrine et devient un granule mature lisse. Les granules matures sont ensuite soit dégradés par les lysosomes, soit stockés et sécrétés par exocytose: il y a alors libération équimolaire de peptide C et d'insuline. La mesure de la concentration plasmatique de peptide C est une évaluation du potentiel sécréteur de la cellule β car sa demi-vie est longue en comparaison de l'insuline. Dans le RE, les molécules de pro-insuline peuvent s'associer en hexamères, forme de stockage nécessitant la présence de zinc (Egea et al., 2005).

La synthèse de l'insuline est régulée en particulier par le glucose à la fois au niveau de la transcription et de la traduction. Des facteurs de transcription tels que PAX6 (paired box gene 6), PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox-1), MafA, et NeuroD1 (B-2/Neurogenic differentiation 1) régulent la transcription du gène de l'insuline (Hagman et al., 2005; Huang et al., 2002; Naya et al., 1997; Sander et al., 1997; Zhao et al., 2005). La traduction et la stabilité de l'ARNm de la pré-pro-insuline sont contrôlées par des séquences retrouvées dans les régions non-codantes de l'ARNm (Giddings et al., 1982).

1.5.2 Sécrétion d'insuline induite par les nutriments

Une augmentation du métabolisme du glucose dans la cellule β suite à une augmentation de la glycémie mène à une élévation du rapport ATP/ADP, la fermeture des canaux K^+ sensibles à l'ATP (K_{ATP}), la dépolarisation de la membrane plasmique, et l'activation des canaux Ca^{2+}

voltage-dépendants. L'élévation ultérieure de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire déclenche la fusion de granules d'insuline à la membrane plasmatique, ce qui entraîne l'exocytose (Aguilar-Bryan et al., 1995; Ashcroft, 1991; Ashcroft et al., 1984; Henquin, 2011; Straub and Sharp, 2002) (Figure 9).

En plus du glucose, d'autres nutriments tels que des acides aminés et des acides gras régulent aussi la sécrétion d'insuline (Nolan et al., 2006b; Prentki et al., 2013).

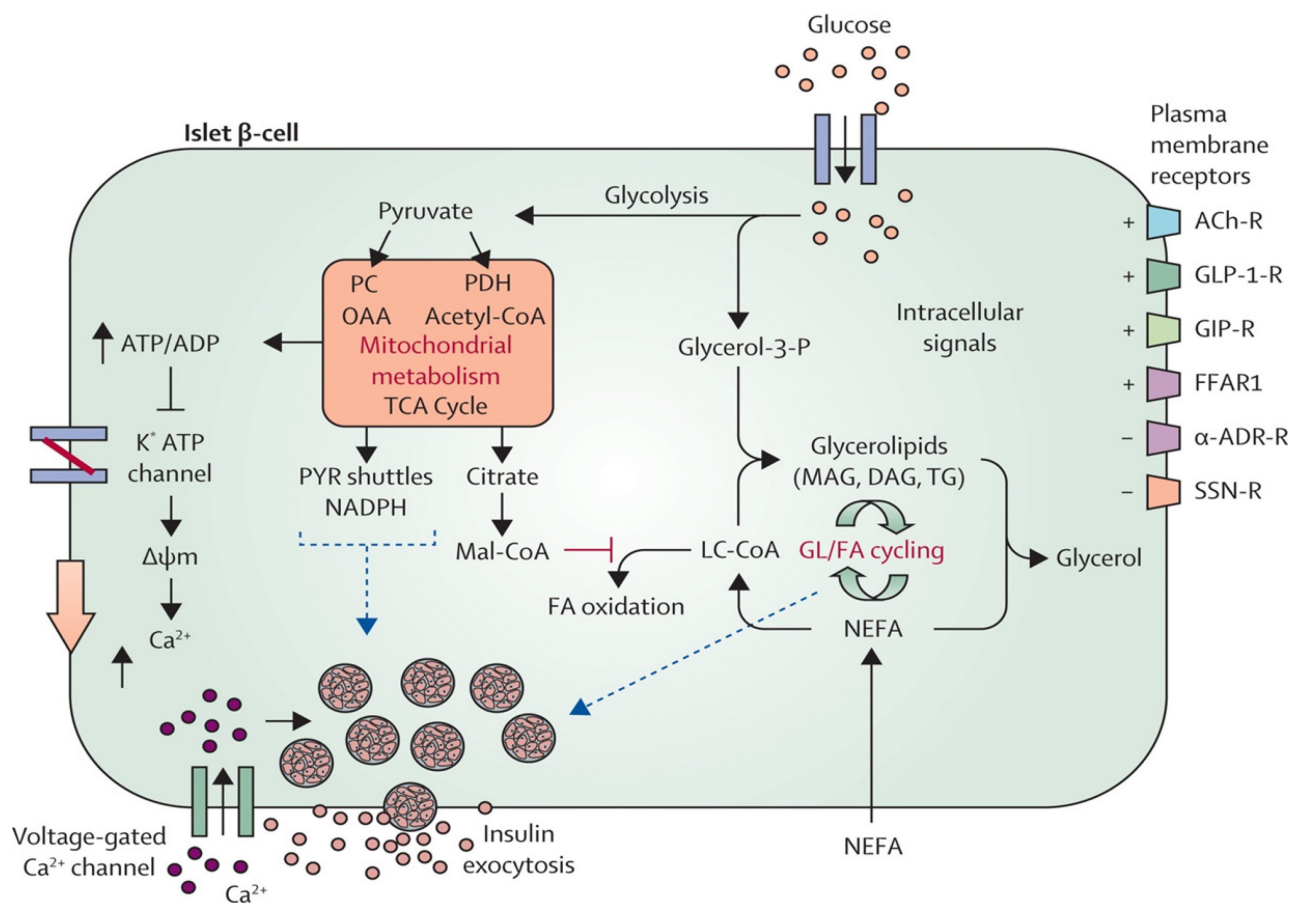


Figure 9. Mécanismes impliqués dans la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatique β. Voir le texte pour une description des mécanismes. NEFA, acides gras non-estérifiés; PC, pyruvate carboxylase, PDH, pyruvate déshydrogénase. Ach-R, récepteur de acétylcholine; GIP-R, récepteur du polypeptide insulinothropique dépendant du glucose; GLP-1-R, récepteur du glucagon-like-peptide-1; FFAR1, récepteur des acides gras libres-1; α-ADR-R, récepteur α2-adrénergique; SSN-R, récepteur de la somatostatine; OAA, oxaloacétate; Δψm, changement du

potentiel de membrane; Mal-CoA, malonyl-CoA (*Nolan et al., Lancet. 2011 Jul 9;378(9786):169-81*).

1.5.2.1 Caractéristiques des cellules β pancréatiques

Les cellules β possèdent plusieurs caractéristiques qui leur permettent de mesurer précisément les niveaux de glucose plasmatique. Elles ne semblent pas contenir de récepteurs membranaires du glucose jouant un rôle important dans la SIIG, mais sont équipés de plusieurs dispositifs de détection capable de mesurer le glucose circulant. Le transporteur du glucose 2 (GLUT2), exprimé de manière constitutive dans la cellule β , est le premier capteur de glucose trouvé dans ces cellules. Le glucose s'équilibre dans la cellule β de rongeur par diffusion facilitée grâce au GLUT2 (GLUT 1 chez l'humain). Ces transporteurs (GLUT1/2) sont les seuls à être exprimé dans les cellules β . GLUT2 est également exprimé dans le foie, et en moindre quantité, dans les cellules rénales et intestinales. Contrairement aux GLUT4, exprimés principalement dans les cellules musculaires et adipeuses, la mobilisation des GLUT2 de la membrane plasmique est indépendante de l'insuline et cette protéine présente une faible affinité au substrat, assurant ainsi un flux élevé de transport du glucose. Une fois entré dans la cellule, le glucose est phosphorylé par la glucokinase, un sous-type d'hexokinase. La glucokinase est exprimée dans seulement quatre types de cellules chez les mammifères: les cellules hépatiques, les cellules β , les entérocytes, et les neurones sensibles au glucose (Suckale and Solimena, 2008). Deux propriétés importantes de la glucokinase lui permettent de fonctionner comme détecteur de glucose dans les cellules β et ces propriétés la distinguent des autres hexokinases. Premièrement, elle possède une affinité relativement faible pour le glucose comparé aux autres hexokinases. Son K_m est de 6 mmol/l, correspondant aux valeurs de glycémie normale (4-10 mmol/l), tandis que les autres hexokinases fonctionnent à vitesse maximale à cette concentration de glucose. La deuxième propriété, est qu'elle n'est pas inhibée par son produit. Cette fonctionnalité lui permet d'être perpétuellement active en dépit d'un flux glycolytique élevé. Par conséquent, la glucokinase est l'étape cinétiquement limitante dans le métabolisme du glucose dans la cellule β et elle est considérée comme un détecteur important du glucose (Suckale and Solimena, 2008).

Dans les cellules β , le produit final de la glycolyse est le pyruvate qui est ensuite oxydé par les mitochondries via le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP. Dans d'autres types de cellules, le pyruvate peut être converti en lactate par la lactate déshydrogénase. Cependant, puisque les

cellules β ne possèdent pas ou peu de cette enzyme, le pyruvate est métabolisé principalement dans la mitochondrie pour produire des facteurs de couplage métaboliques. L'oxydation du pyruvate à travers le cycle de Krebs est la voie de signalisation majeure couplée à la sécrétion d'insuline dépendante des canaux K_{ATP} . En revanche des produits provenant de l'anaplérose, tels le NADPH, malonyl-CoA et le glutamate, peuvent agir comme des signaux pour la sécrétion d'insuline via l'amplification du signal Ca^{2+} produit par la fermeture des canaux K_{ATP} (Chang and Goldberg, 1978; Maechler and Wollheim, 1999).

Une étape importante de la cascade signalétique du glucose est la formation du glycerol-3-phosphate (Gro3P). Après la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase, le G6P peut entrer dans la glycolyse pour produire du pyruvate. Cependant, il peut également être métabolisé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP), qui va ensuite être transformé en Gro3P par une enzyme cytosolique appelée glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH). Le Gro3P est important pour générer des facteurs de couplage métaboliques lipidiques tels que les acyl-CoA à longue chaîne, le DAG et le MAG qui peuvent augmenter la sécrétion d'insuline (Prentki et al., 2002; Zhao et al., 2014). Cette voie, appelée «cycle GL/FFA» que nous avons mentionné plus haut pour d'autres aspects est une voie alternative, indépendante du métabolisme mitochondrial du glucose, pour la production des facteurs de couplage métaboliques capable de stimuler la sécrétion d'insuline. Le Gro3P peut également permettre la reformation du NAD^+ afin de promouvoir la glycolyse des cellules β via la navette mitochondriale Gro3P/NADH, qui active alors le métabolisme énergétique mitochondrial et déclenche la sécrétion d'insuline (Bender et al., 2006; Eto et al., 1999).

1.5.2.2 Rôle des acides gras dans la sécrétion de l'insuline induite par le glucose

Les acides gras influencent également la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ils potentialisent, par exemple, la sécrétion d'insuline pour compenser un besoin accru d'insuline suite à la RI dans le DT2 (McGarry, 2002; Nolan et al., 2006a; Prentki et al., 2002). Les îlots déprivés en TG et acides gras ont une moindre SIIG, qui peut être inversée par des acides gras exogènes (Crespin et al., 1969; Roduit et al., 2004; Stein et al., 1996). Les cellules β possèdent aussi un récepteur aux FFA, le FFAR-1/GPR40, à travers lequel les FFA influencent la fonction des cellules β (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003) via la production de DAG, Inositol 1,4,5

trisphosphate et l'activation de la protéine kinase D1 (Ferdaoussi et al., 2012). Le métabolisme intracellulaire des FFA est à l'origine de la synthèse de molécules de signalisation telles que les acyl-CoA à longue chaîne (Prentki et al., 2002), le DAG (Prentki, 1996; Prentki et al., 2002) et le MAG (Zhao et al., 2014). Les acyl-CoA à longue chaîne pourraient acyler des protéines essentielles à la fusion des granules d'insuline, tels que la SNAP-25 (synaptosomal-associated protein-25) et la synaptotagmine (Chapman et al., 1996; Gonzalo and Linder, 1998). DAG active la PKC, une protéine impliquée dans la sécrétion d'insuline (Prentki and Matschinsky, 1987). Il se lie également à la protéine synaptique d'amorçage de vésicules appelée Munc-13-1, afin de promouvoir la sécrétion d'insuline (Rhee et al., 2002), un processus utilisé aussi par le MAG, lequel est plus puissant que le DAG pour lier Munc-13-1 (Zhao et al., 2014).

1.5.2.3 Acides aminés

Les acides aminés individuels, à des concentrations physiologiques, ont un effet insulino-sécrétoire très faible. Cependant, certaines combinaisons d'acides aminés, à des concentrations physiologiques ou plus élevées, peuvent augmenter la SIIG (Sener and Malaisse, 1980). Par exemple, la glutamine seule ne stimule pas la sécrétion d'insuline et n'amplifie pas la SIIG, mais une combinaison de glutamine et de leucine amplifie la SIIG des cellules β (Dixon et al., 2003). L'effet de la leucine est dû à son activation de la glutamate déshydrogénase, qui convertit le glutamate en α -ketoglutarate. La glutamine, après être convertie en glutamate par la glutaminase dans le cytosol, peut entrer dans le cycle de Krebs par l'intermédiaire de l' α -ketoglutarate, ce qui entraîne la production d'ATP et améliore la sécrétion d'insuline (Sener and Malaisse, 1980). Sans la leucine, la glutamine est métabolisée en acide gamma-aminobutyrique (GABA) et aspartate. En outre, certains acides aminés peuvent influencer indirectement la sécrétion d'insuline. Au cours de la période de jeûne, les protéines dans le muscle squelettique sont catabolisées et des acides aminés sont ensuite métabolisés pour générer de l'énergie. Les acides aminés libres, y compris l'alanine et la glutamine, sont libérées dans le sang et servent de sécrétagogues puissants pour le glucagon. Il en résulte une augmentation des niveaux de glucose dans le sang, ce qui déclenche alors la sécrétion d'insuline (Fu et al., 2013). Les acides aminés alimentaires peuvent également induire la sécrétion d'insuline par l'intermédiaire de mécanismes induits par les incrétines (Fu et al., 2013). Tel que discuté dans les paragraphes précédents (*section 1.2.4.4.2.*), la GIP et la GLP-1 sont les deux principales hormones incrétines sécrétées par le tractus gastro-

intestinal. L'ingestion de nutriments dans l'intestin, y compris le glucose et les acides aminés, stimule la sécrétion de ces hormones par les cellules K et L de l'intestin. Ces hormones agissent alors directement sur les cellules β en se liant à leurs récepteurs spécifiques, augmentant ainsi la SIIG (MacDonald et al., 2002a; MacDonald et al., 2002b; Tang-Christensen et al., 2001; Zhao et al., 2016).

1.5.3 Signalisation métabolique dans la sécrétion d'insuline

Les stimuli nutritionnels, tels que le glucose, favorisent l'exocytose des granules d'insuline principalement via leur métabolisme dans la cellule β et la production de métabolites clé de signalisation, appelés facteurs de couplages métaboliques (FCM) (Prentki et al., 2013). Un FCM est un signal qui joue un rôle essentiel, mais pas forcément suffisant, dans la sécrétion d'insuline induite par les nutriments (SIIN), soit parce que c'est un régulateur des voies métaboliques crucialement impliquées dans la régulation des nutriments, soit parce que c'est un effecteur modulant l'activité de certaines protéines importantes dans la signalisation membranaires ou le mécanisme d'exocytose (Prentki et al., 2013). Donc, il peut y avoir deux types de FCM: (1) des FCM *régulateurs* capable de moduler les voies métaboliques clés impliqués dans la SIIN, et (2) des FCM *effecteurs* impliqués directement dans le système de déclenchement et d'amplification de la SIIN (Figure 10). Le FCM le plus connu et mieux établi pour la SIIN est l'ATP. Cependant, des évidences émergentes supportent le fait qu'il existe d'autres processus métaboliques qui déclencheraient la SIIN indépendamment aux voies classiques comme la voie ATP/canaux K_{ATP} (Henquin et al., 2009; Jitrapakdee et al., 2010; Muoio and Newgard, 2008).

La régulation de la SIIN au niveau des cellules β est assurée par un équilibre entre les voies qui produisent les FCM et par des modulateurs négatifs (enzymes et des voies qui interfèrent avec la production des FCM) et par les signaux de dégradation (les enzymes et les voies qui dégradent les FCM) (Figure 10).

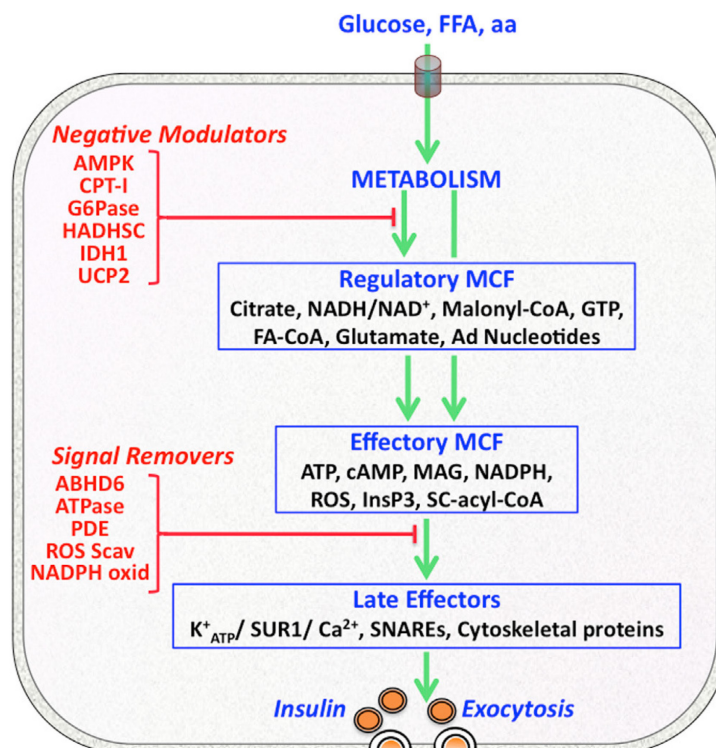


Figure 10. Signalisation métabolique dans la sécrétion d'insuline. Voir le texte pour la description. CPT-I, carnitine palmitoyltransferase I; G6Pase, glucose-6-phosphatase, HADHSC, short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; IDH1, cytosolic isocitrate dehydrogenase isozyme 1; UCP2, protéine découplante 2; InsP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; SC-acyl-CoA, acyl-CoA à courte chaîne; ABHD6, α/β -hydrolase domain 6; SUR1, sous-unité régulatrice des canaux K_{ATP} et cible des sulfonyleurés (*Prentki et al. Cell Metab. 2013 Aug 6; 18(2):162-85*).

1.5.3.1 FCM dérivés des voies d'anaplérose et cataplérose

Dans les cellules β , l'anaplérose et la cataplérose sont des processus qui permettent d'augmenter les niveaux des intermédiaires du cycle de Krebs et leur sortie vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, certains de ces intermédiaires sont transformés et utilisés comme FCM (Figure 11). Plusieurs études ont démontré que le cycle du pyruvate joue un rôle important dans la stimulation de la SIIG. L'enzyme anaplérotique PC est bien exprimée dans les cellules β , et son niveau est réduite dans les îlots des patients atteints de DT2 (Jensen et al., 2006). Les niveaux d'expression de la PC corrént de manière dose dépendante avec la SIIG. Tels que discuté dans les sections précédentes, une diminution de l'activité de la PC, soit par un inhibiteur

pharmacologique ou en altérant sa régulation, diminue la SIIG tandis qu'une augmentation de son activité en la surexprimant augmente la sécrétion d'insuline (Farfari et al., 2000).

Le cycle du pyruvate augmente le flux glycolytique via la ré-oxydation du NADH et la production de différents FCM tels que le malonyl-CoA, le NADPH (Guay et al., 2007), le glutamate et le GTP (Figure 11). Le malonyl-CoA est formé par carboxylation de l'acétyl-CoA, catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (Roduit et al., 2004). Le malonyl-CoA est un métabolite important capable de réguler l'oxydation des acides gras en inhibant allostériquement la carnitine palmitoyl-transférase allostérique 1 (CPT1). Plusieurs études ont pu démontrer que la malonyl-CoA pouvait agir comme un FCM (Prentki et al., 2002; Roduit et al., 2004). Les niveaux de malonyl-CoA corrélaient bien avec la SIIG. La diminution de l'activité de l'ACC, par les inhibiteurs spécifiques ou via une régulation négative, mène à une réduction de la SIIG, tandis que la surexpression de l'ACC augmente le niveau de la malonyl-CoA et donc la SIIG, même en présence des FFA (Figure 9).

D'autres études mettent en lumière le NADPH comme FCM pour la sécrétion d'insuline (MacDonald et al., 2006; Pongratz et al., 2007). Le rapport NADPH/NADP est bien corrélé avec la SIIG dans des îlots de rat et de souris ainsi que dans différentes lignées de cellules β . L'augmentation des niveaux du NADPH par administration exogène améliore la SIIG tandis que sa diminution via un knock-down des enzymes maliques réduit la SIIG. En ce qui concerne le mécanisme d'action du NADPH, il a été suggéré que le NADPH et le NADP^+ contrôlent les formes oxydée et réduite de la glutarédoxine redox (GRX) et la GRX peut réguler l'exocytose directement via une modification post-traductionnelle (changement de l'état redox des protéines exocytotiques). En outre, l'injection de la GRX potentialise la sécrétion d'insuline induite par le NADPH. La surexpression de GRX1 augmente la SIIG et la régulation négative de GRX1 réduit la SIIG dans les îlots de rat (Reinbothe et al., 2009). Une étude récente suggère que l'axe NADPH-GSH amplifie la SIIG via la sentrin/SUMO-spécifique protéase-1 (SENP1) causant une désumoylation de protéines d'exocytose (Ferdaoussi et al., 2015).

L'idée comme quoi le glutamate agit comme FCM est soutenue par l'observation montrant que le glutamate augmente directement l'exocytose des granules d'insuline dans des lignées de cellules β (Maechler and Wollheim, 1999). Le glutamate est produit pendant la cataplérose et l'anaplérose via la réaction de transamination (Bertrand et al., 2002). Le niveau de glutamate est bien corrélé avec la SIIG, et la réduction du niveau de glutamate par la surexpression de la

glutamate décarboxylase diminue la SIIG (Maechler and Wollheim, 1999). En outre, une mutation activante de la glutamate déshydrogénase chez l'homme et la souris est associée à une hyperinsulinémie (Palladino and Stanley, 2010; Vetterli et al., 2012). Néanmoins le rôle du glutamate dans la sécrétion d'insuline est débattu. Actuellement on pense que la glutamate déshydrogénase fonctionne dans les conditions physiologiques dans la direction glutamate-alfa-ketoglutarate (Figure 11) et que l'hyperinsulinémie chez ces patients est due à un flux accéléré de l'enzyme dans cette direction causant une accélération de l'anaplérose, contrairement à l'hypothèse d'un rôle du glutamate comme FCM (Prentki et al., 2013).

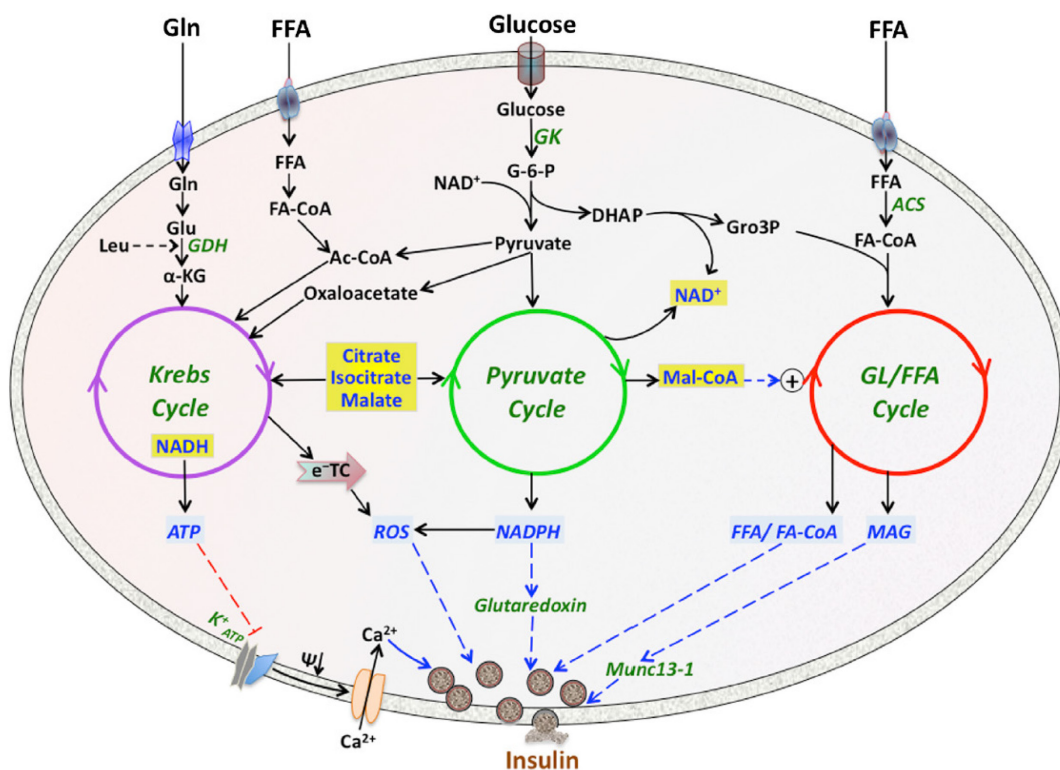


Figure 11. Différentes voies métaboliques générant des facteurs de couplage métaboliques pour la sécrétion d'insuline. Les FCMs (en bleu) résultent de l'activité et l'intégration de trois cycles métaboliques que sont : le cycle de Krebs, le cycle du pyruvate et le cycle GL/FFA. Ces cycles permettent la production de FCMs via la métabolisation des nutriments entrant dans la cellule. Les FCMs régulateurs sont surlignés en jaune et les FCMs effecteurs sont surlignés en bleu (Prentki et al. *Cell Metab.* 2013 Aug 6; 18(2):162-85).

1.5.3.2 FCM dérivés de l'activité énergétique mitochondriale

En plus de l'ATP, le GTP a aussi été proposé comme FCM. Le niveau de GTP est augmentée avec l'augmentation de la concentration de glucose (Kibbey et al., 2007). La production mitochondriale du GTP est catalysée par une succinyl-CoA synthase spécifique au GTP (GTP-SCS). Il a été démontré que le GTP pouvait augmenter directement la sécrétion d'insuline indépendamment du calcium. Certaines études montrent que l'effet du GTP sur la sécrétion d'insuline peut impliquer certaines petites protéines G (Kowluru, 2003). La réduction du niveau de la GTP-SCS est associée à une diminution de la sécrétion d'insuline, suggérant fortement que le GTP est un FCM (Kibbey et al., 2007)

1.5.3.3 Le Cycle GL/FFA et la signalisation lipidique pour la sécrétion d'insuline

Le rôle du cycle GL/FFA dans la régulation de la sécrétion d'insuline est bien établi. Le glucose augmente à la fois la lipogénèse et la lipolyse, deux activités essentielles du cycle GL/FFA (Prentki and Madiraju, 2012). L'augmentation de la lipogénèse et la lipolyse corrèle bien avec la SIIG. La stimulation du cycle GL/FFA par l'activation du récepteur X hépatique (par des stérols) qui stimule la lipogénèse ou par la délétion de la PKC ϵ qui entraîne une augmentation de la lipolyse est associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline (Calkin and Tontonoz, 2012; Schmitz-Peiffer et al., 2007). Inversement, le blocage de la lipolyse par l'orlistat (inhibiteur des lipases) restreint la SIIG. De même, la diminution de l'activité de divers lipases, tels que l'ATGL et la HSL, soit par des inhibiteurs pharmacologiques ou par régulation négative ou par délétion de gènes spécifiques, réduit la SIIG (Peyot et al., 2009b; Peyot et al., 2004; Tang et al., 2013). Toutes ces données appuient fortement le rôle du cycle GL/FFA dans la sécrétion d'insuline.

Différents métabolites générées par le cycle GL/FFA, y compris les DAG, les FFA et les acides gras sous forme d'acyl-CoA (FA-CoA), peuvent agir comme des FCM et potentialiser la sécrétion d'insuline (Prentki et al., 2013). Les rôles des FFA et des FA-CoA dans la sécrétion d'insuline ont été discutés dans les sections précédentes. L'augmentation des niveaux de DAG par voie exogène ou l'addition de PMA (un analogue du DAG activant les PKC), augmente la SIIG (Zawalich and Rasmussen, 1990). Cependant, certains éléments récents sur la stéréospecificité des lipases questionnent le rôle de la DAG lipolytique dans la sécrétion d'insuline (Eichmann et al., 2012). Il a été démontré que l'hydrolyse des TG par l'ATGL génère du 1,3-DAG et du 2,3-DAG et non du 1,2-DAG, un second messager classique qui activent la

PKC et Munc13-1. Par contre, ni le 1,3-DAG ou 2,3-DAG sont connus pour activer la PKC ou Munc13-1. De plus, la suppression de la HSL, qui mène à l'accumulation du 2,3-DAG à l'intérieur des cellules, diminue la SIIG. Tous ces éléments vont à l'encontre de l'hypothèse définissant la DAG lipolytique comme étant une molécule de signalisation dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Notre groupe a pu démontrer récemment que c'est plutôt le MAG et non le DAG lipolytique qui agit comme FCM pour la sécrétion d'insuline. En effet, l'accumulation du MAG, suite à une suppression d'une MAG lipase appelée ABHD6 (alpha/bêta hydrolase domaine 6) augmente la SIIG (Zhao et al., 2014). De plus, il est connu que HSL produit le MAG et que sa suppression diminue la SIIG.

1.5.3.4 FCM dérivés du transport des électrons

Le cycle de Krebs permet le transfert d'électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant à la génération d'ATP. Plusieurs études indiquent que la chaîne de transport d'électrons mitochondriale joue un rôle important dans la génération de divers FCM pour la sécrétion d'insuline, tels que l'ATP, l'ADP et les ROS, d'autant plus que l'inhibition de différents complexes de la ETC est associée à une réduction de la SIIG (Prentki et al., 2013).

Comme nous l'avons vu précédemment, le rôle de l'ATP et ADP dans la régulation des canaux K_{ATP} est bien établie (Ghosh et al., 1991; Loubatieres-Mariani et al., 1979). Les canaux K_{ATP} sont inhibés par l'augmentation intracellulaire d'ATP induites par le glucose alors que le Mg-ADP est responsable de l'ouverture des canaux. Avec des taux de glucose élevés, le niveau d'ADP est réduit et contribue aussi à la fermeture des canaux K_{ATP} . Il a été proposé que l'ATP est nécessaire pour l'amorçage «priming» de granules d'insuline et leur transport intracellulaire et qu'il est aussi impliqué directement dans leur exocytose. Quelques études montrent qu'il existe une corrélation entre les niveaux élevés d'ATP et la deuxième phase de la sécrétion d'insuline dans les îlots de souris.

D'autres cibles des nucléotides et de leurs dérivés jouent également un rôle dans la sécrétion d'insuline. Quand les niveaux de glucose sont élevés, le rapport AMP/ATP diminue, ce qui modifie l'activité de l'AMPK, un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline (Lamontagne et al., 2009; Leclerc et al., 2004; Targonsky et al., 2006). L'AMPc joue également un rôle dans la sécrétion d'insuline en tant que FCM. Les niveaux d'AMPc augmentent avec la concentration du glucose car sa formation dépend de l'ATP qui est le substrat des adénylates cyclases

responsables de la transformation de l'ATP en AMPc (Prentki and Matschinsky, 1987). Les changements intracellulaires d'AMPc corréleront bien avec la sécrétion d'insuline (Yajima et al., 1999). L'AMPc agit via une protéine kinase A et l'Epac2, deux régulateurs de l'exocytose des granules d'insuline (Dzhura et al., 2011; Seino and Shibasaki, 2005; Yasuda et al., 2010).

Le rôle des ROS dans la fonction des cellules β dépend de sa concentration et le temps d'exposition des cellules aux ROS. Tels que mentionné dans les chapitres précédents, l'exposition chronique des ROS entraîne un dysfonctionnement des cellules β . En revanche, présents de façon aiguë, les ROS peuvent agir comme des FCM pour potentialiser la sécrétion d'insuline (Leloup et al., 2009). Le glucose augmente les niveaux de ROS dans les îlots de rongeurs et des lignées de cellules β . Une baisse des niveaux de ROS par l'utilisation d'anti-oxydant réduit la SIIG (Pi et al., 2007). En outre, l'augmentation de la sécrétion d'insuline induite par des concentrations faibles de H_2O_2 (de l'ordre du $\mu\text{mol/l}$), est abolie par les anti-oxydants et la surexpression d'enzymes anti-oxydantes telles que la SOD et la catalase dans les cellules β réduit la SIIG (Pi et al., 2007). Cependant, certaines études ont montré qu'une production de H_2O_2 via l'inactivation de la catalase dans les îlots n'affectait pas la SIIG (Lortz et al., 2013). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour évaluer le rôle exact des ROS en tant que FCM dans la sécrétion d'insuline.

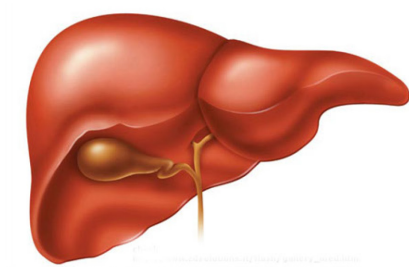
1.6 Hépatocytes et métabolisme énergétique

Le foie est un organe essentiel pour le métabolisme énergétique, et son activité métabolique est étroitement contrôlée par l'insuline, le glucagon et d'autres hormones métaboliques (Figure 12). À l'état postprandial, les produits dérivés de la glycolyse (tel le malonyl-CoA) sont utilisés pour synthétiser des acides gras via la lipogenèse *de novo* (Figure 13). Dans les hépatocytes, les acides gras à longue chaîne sont stockés sous forme de TG, de phospholipides, et d'esters de cholestérol, et ces lipides complexes sont stockés dans des gouttelettes lipidiques et dans des structures membranaires, ou sécrétés dans la circulation sous forme de particules de VLDL. Dans l'état de jeûne, le foie produit et sécrète du glucose via la dégradation du glycogène (glycogénolyse) et la synthèse *de novo* du glucose (gluconéogenèse). Pendant un jeûne prolongé, la gluconéogenèse hépatique est la principale source de la production du glucose endogène. Le jeûne favorise également la lipolyse dans le tissu adipeux libérant ainsi des FFA qui sont ensuite convertis en corps cétoniques dans le foie à travers la β -oxydation

mitochondriale et la cétogenèse. Les corps cétoniques fournissent de l'énergie pour les tissus extra-hépatiques comme le cerveau par exemple. Les processus métaboliques au niveau hépatique sont étroitement régulés par des systèmes neuronaux et hormonaux. Le système sympathique stimule, alors que le système parasympathique supprime, la gluconéogenèse hépatique. L'insuline stimule la lipogénèse et la glycolyse, mais supprime la gluconéogenèse; le glucagon contrecarre l'action de l'insuline. De nombreux facteurs et co-activateurs de transcription, y compris CREB, FOXO1, ChREBP, SREBP, LXR, PPAR α , PGC-1 α , et CRTC2, contrôlent l'expression des enzymes qui catalysent des étapes importantes dans les processus métaboliques du foie, contrôlant ainsi son métabolisme énergétique. Une dysfonction du métabolisme du foie peut conduire à une RI, un DT2 et des maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD) (Marchesini et al., 1999; Marchesini et al., 2005; Moscattiello et al., 2007).

Postprandial:

- Absorption du glucose ↑
- La glycolyse ↑
- Lipogenèse *de novo* (dans certaines conditions)
- Activité de la glucokinase ↑
- Glycogénogenèse



Réalimenté:

- Absorption du glucose ↓
- Reste en mode gluconéogénique
- Glycogénogenèse (en utilisant le glucose hépatique nouvellement synthétisé)
- Possible lipogenèse *de novo*

À jeun:

- Glycogénolyse
- Gluconéogenèse
- Activité de la G6Pase ↑
- Libération du glucose
- Absorption et oxydation des FFAs ↑
- Production des corps cétoniques

Figure 12. Changements du métabolisme énergétique du foie à l'état postprandial, à jeun et lors d'une réalimentation. G6Pases, glucose-6-phosphate phosphatase; FFA, acides gras libres.

1.6.1 Glycogénolyse et gluconéogenèse

Les hépatocytes sont le principal type cellulaire du foie (~ 80%) (Si-Tayeb et al., 2010). Le glucose sanguin entre dans les hépatocytes via GLUT2, un transporteur membranaire de

glucose. Un knock-out spécifique de GLUT2 dans les hépatocytes bloque l'absorption du glucose (Seyer et al., 2013). GLUT2 permet également la libération du glucose à partir du foie. Cependant, la suppression de GLUT2 n'affecte pas la production hépatique de glucose à jeun (Seyer et al., 2013), ce qui suggère que le glucose est en mesure d'être libéré par les hépatocytes à travers d'autres transporteurs (par exemple GLUT1) ou par d'autres mécanismes. Le glucose est phosphorylé par la glucokinase dans les hépatocytes pour générer du glucose-6-phosphate (G6P), conduisant à une réduction des concentrations de glucose intracellulaire, ce qui augmentera davantage l'entrée du glucose. De plus, le G6P ne peut pas être transportés par des transporteurs de glucose, donc il est retenu à l'intérieur des hépatocytes. En état postprandial, le G6P agit comme précurseur pour la synthèse du glycogène. Il est également métabolisé pour produire du pyruvate par la glycolyse et par la suite de l'ATP. Alternativement, le pyruvate est utilisé pour la synthèse des acides gras à travers la lipogenèse *de novo*. Le G6P est également métabolisé via la voie des pentoses phosphates pour générer du NADPH (Figure 13). Le NADPH est nécessaire pour la lipogenèse et la biosynthèse de molécules bioactives telles que le cholestérol et le glutathion réduit (GSH) (Rush et al., 1985).

À jeun, le glycogène est hydrolysé par la glycogène phosphorylase pour générer du glucose via le G6P, c'est la glycogénolyse. Ce G6P issu de la glycogénolyse est transporté dans le RE et déphosphorylé par la glucose-6 phosphatase (G6Pase) pour libérer du glucose.

Le G6P est un précurseur pour la synthèse du glycogène, et il est également un inhibiteur allostérique de la glycogène phosphorylase et un activateur allostérique de la glycogène synthase, donc il augmente les niveaux de glycogène hépatique (Agius, 2008). Les activités de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase sont également régulés par les modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de la glycogène synthase, principalement par la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), inhibe l'activité de la glycogène synthase; en revanche, la phosphorylation de la glycogène phosphorylase augmente son activité. Ces deux enzymes, la glycogène synthase et la glycogène phosphorylase sont capables d'être déphosphorylés par la phosphatase protéine 1. Dans l'état postprandial, l'insuline est sécrétée par les cellules β pancréatiques en réponse à une augmentation des niveaux de glucose, sanguin. L'insuline stimule l'activation de la glycogène synthase en activant l'Akt qui, à son tour, phosphoryle et inactive la GSK-3, ce qui augmente la synthèse du glycogène. L'insuline stimule l'acétylation de la glycogène phosphorylase, ce qui favorise la déphosphorylation et l'inhibition

de la glycogène phosphorylase par la protéine phosphatase 1, supprimant ainsi la glycogénolyse (Zhang et al., 2012). L'insuline stimule l'expression de la glucokinase qui augmente l'entrée du glucose dans les hépatocytes en phosphorylant le glucose et générant du G6P (Agius, 2008). Le G6P stimule, à son tour, la synthèse du glycogène et inhibe la glycogénolyse.

À jeun, il y a moins d'insuline sécrétée, ce qui conduit à l'inhibition de la glycogène synthase et l'activation de la glycogène phosphorylase. En outre, le glucagon et les catécholamines (par exemple l'adrénaline et la noradrénaline), collectivement appelées hormones de contre-régulation, sont sécrétés par les cellules α pancréatiques et la médullosurrénale, respectivement. Ces hormones se lient à leurs récepteurs couplés aux protéines Gs et activent la protéine kinase A (PKA) en augmentant les taux d'AMPc intracellulaires. La PKA phosphoryle et active la glycogène phosphorylase, en phosphorylant et activant la phosphorylase kinase. Le glucagon inhibe l'acétylation de la glycogène phosphorylase, ce qui diminue la capacité de la protéine phosphatase 1 de se lier à celle-ci, elle devient alors phosphorylée et active (Zhang et al., 2012). Le glycogène peut être également hydrolysé pour générer du glucose par autophagie quand on est à jeun (Kotoulas et al., 2004).

Au cours d'une courte durée de jeûne, le foie produit et libère du glucose principalement à partir de la glycogénolyse. Pendant un jeûne prolongé, les réserves hépatiques de glycogène sont épuisées, et les hépatocytes synthétisent du glucose à travers la gluconéogenèse en utilisant le lactate, le pyruvate, le glycérol, et des acides aminés comme substrats (Figure 13). Ces substrats gluconéogéniques sont soit générés dans le foie ou fournis par les tissus extra-hépatiques via la circulation sanguine. Le lactate est oxydé par la lactate déshydrogénase pour produire du pyruvate. Le pyruvate est transporté dans les mitochondries et converti en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase (Figure 14). L'Oxaloacétate est réduit en malate par la malate déshydrogénase mitochondriale et exporté dans le cytoplasme. Ce malate est ensuite oxydé par la malate déshydrogénase cytoplasmique pour régénérer l'oxaloacétate. L'oxaloacétate cytoplasmique est converti en phosphoénolpyruvate par la phosphoénolpyruvate carboxylase cytoplasmique (PEPCK-C), une étape clé de la gluconéogenèse (Figure 14). Un knock-out total de la PEPCK-C provoque la mort postnatale dans les 3 jours suivant la naissance (She et al., 2000). Des souris avec un knock-out spécifique de PEPCK-C dans les hépatocytes sont viables, mais sont incapables de produire du glucose à partir du lactate et des acides aminés via la gluconéogenèse, ce qui mène à une accumulation des intermédiaires du cycle de Krebs dans les

hépatocytes et à une stéatose hépatique à jeun (Burgess et al., 2004). Cependant, les souris knock-out spécifique de PEPCK-C dans le foie sont capables de générer du glucose à partir du glycérol et de maintenir les niveaux de glucose dans le sang relativement normaux pendant 24 h de jeûne (Burgess et al., 2004; She et al., 2000). Le phosphoénolpyruvate, après de multiples réactions biochimiques, est converti en fructose 1,6-biphosphate (F1,6P) qui est ensuite déphosphorylé par la fructose 1,6 biphosphatase (FBPase) pour produire du fructose-6-phosphate (F6P). Le F6P est converti en G6P, transporté dans le RE, et déphosphorylé par la G6Pase pour générer du glucose (Figure 13).

La déphosphorylation du G6P est une étape limitante à la fois pour la glycogénolyse et la gluconéogenèse. Les souris avec un knock-out spécifique du G6Pase dans les hépatocytes développent de l'hyperlipidémie, de l'acidose lactique, de l'uricémie et une hépatomégalie avec accumulation de glycogène et de la stéatose hépatique (Mutel et al., 2011). Le glycérol, en général provenant du tissu adipeux entre dans les hépatocytes via l'AQP-9 et est phosphorylé par la glycérokinase pour générer du glycérol-3 phosphate (Gro3P), un précurseur de la gluconéogenèse (Jelen et al., 2012). Le Gro3P est converti en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par la Gro3P déshydrogénase (GPDH) mitochondriale, qui par la suite va être converti en F1,6P par une aldolase. Les acides aminés (par exemple le glutamate) sont convertis en acides α -cétoniques par des réactions de désamination catalysées par la glutaminase, la glutamate déshydrogénase, et/ou l'aminotransférase. Les acides α -cétoniques peuvent aussi être convertis en intermédiaires du cycle de Krebs (par exemple, le pyruvate, oxaloacétate, le fumarate, le succinyl-CoA, ou α -kétooglutarate) qui servent de précurseurs pour la gluconéogenèse (Figure 13).

La gluconéogenèse hépatique est largement contrôlée par des régulations transcriptionnelles des enzymes qui catalysent les réactions clés de la gluconéogenèse. De nombreux facteurs de transcription y compris CREB, FOXO1, et C/EBP α/β , ont été identifiés comme stimulant de l'expression de la PEPCK, de la G6P phosphatase et du PGC1 α (Erion et al., 2009; Herzig et al., 2001; Matsumoto et al., 2007; Wang et al., 1995). Certains de ces facteurs (par exemple FOXO1) régulent à la fois la gluconéogenèse et la glycogénolyse (Matsumoto et al., 2007).

1.6.2 Lipogenèses *de novo*

Lorsque les glucides sont abondants, le foie non seulement utilise du glucose comme source principale d'énergie, mais parallèlement accumule ce glucose sous forme de glycogène, et convertit également le glucose en acides gras. Les hépatocytes captent également des acides gras à partir de la circulation sanguine, qui sont libérés à partir du tissu adipeux (à l'état de jeûne) ou absorbé au niveau intestinal après la digestion des aliments. Les acides gras sont estérifiés avec le Gro3P provenant de la glycolyse pour générer des TG (Figure 7) ou avec le cholestérol pour produire des esters de cholestérol. Les TG et les esters de cholestérol sont soit stockés dans des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes ou sécrétés dans la circulation sous forme de VLDL (lipoprotéines de très basse densité). Les acides gras sont également incorporés dans les phospholipides, qui sont des composants essentiels des membranes cellulaires et de la couche des surfaces des gouttelettes lipidiques, des VLDL et des particules biliaires. Dans l'état de jeûne, des acides gras sont oxydés principalement dans les mitochondries pour produire de l'énergie ainsi que des corps cétoniques principalement le β -D-hydroxybutyrate (Fukao et al., 2014).

Le foie est le principal organe qui convertit les glucides en acides gras. Les acides gras sont emballés dans les VLDL et livrés aux tissus adipeux et d'autres tissus extra-hépatiques à travers la circulation sanguine. La lipogenèse débute par le glucose qui est oxydé en pyruvate via la glycolyse. Le pyruvate est transporté vers les mitochondries et métabolisé par la pyruvate déshydrogénase pour générer de l'acétyl-CoA (Figure 14). L'acétyl-CoA est ensuite combiné avec l'oxaloacétate par la citrate synthase pour former du citrate pour former la première étape du cycle de Krebs. Cependant le citrate ne poursuivra pas le cycle et il est exporté (cataplérose) vers le cytoplasme et retransformé en acétyl-CoA et en oxaloacétate par l'ATP-citrate lyase (ACL). L'oxaloacétate est réduit en malate converti à son tour en pyruvate par l'enzyme malique, libérant ainsi du NADPH. Le pyruvate est recyclé dans les mitochondries et carboxylé par la PC afin de former de l'oxaloacétate qui entraîne une synthèse continue de citrate (Figure 14).

Dans le cytoplasme, l'acétyl-CoA est carboxylé par l'ACC pour former le malonyl-CoA. Le malonyl-CoA et le NADPH sont utilisés comme précurseurs pour la synthèse de l'acide palmitique (16 carbones) par la synthase des acides gras (FAS : Fatty acid synthase) (Figure 14). Les mammifères possèdent deux gènes d'ACC, ACC1 et ACC2 dont les protéines sont situées dans le cytoplasme et la membrane mitochondriale externe, respectivement. La suppression totale de l'ACC1 provoque la mort des embryons (Abu-Elheiga et al., 2005). La suppression

spécifique de l'ACC1 dans les hépatocytes diminue les niveaux de malonyl-CoA, de TG, et la synthèse *de novo* des lipides (Mao et al., 2006). Cependant, une étude distincte a signalé que la suppression spécifique de l'ACC1 dans les hépatocytes ne modifiait pas les niveaux de malonyl-CoA et la lipogenèse dans le foie, probablement en raison d'une augmentation compensatoire de l'expression de l'ACC2 (Harada et al., 2007). L'inhibition transitoire des ACC1 et ACC2 dans le foie diminue les taux hépatique de malonyl-CoA et de la lipogenèse, augmente la β -oxydation, et protège contre la stéatose hépatique (Savage et al., 2006). Les souris avec une délétion spécifique de FAS dans le foie sont normales (Chakravarthy et al., 2005), ce qui suggère que l'absorption d'acide gras est suffisante pour maintenir le contenu lipidique hépatique normale en l'absence de FAS dans le foie. De manière intéressante, après avoir été nourris avec une diète sans gras et riche en glucides, ces souris mutantes développent du foie gras et une hypoglycémie qui sont renversées par des traitements avec des agonistes de PPAR α (Chakravarthy et al., 2005). Une interprétation possible est que le palmitate et autres dérivés de la FAS servent de ligands endogènes pour PPAR α et stimulent l'oxydation des acides gras dans le foie (Chakravarthy et al., 2009; Chakravarthy et al., 2005).

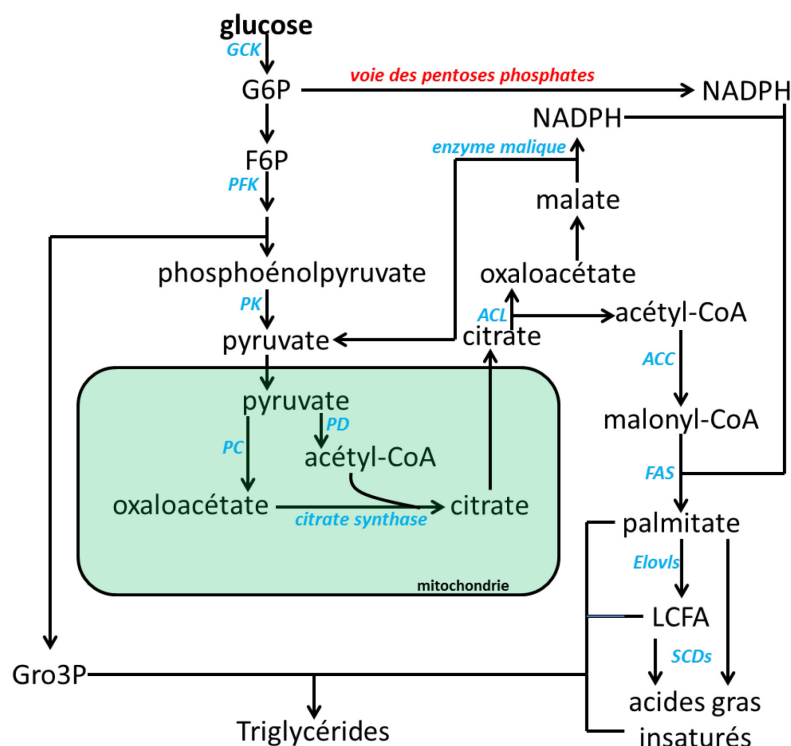


Figure 14. Illustration des différentes voies lipogéniques. En bleu, les principales enzymes lipogéniques. ACL: ATP-citrate lyase; ACC: acétyl-CoA carboxylase; FAS: synthase des acides gras; Elovl6: Élongases d'acides gras sous forme d'acyl-CoA; SCDs: désaturases de stéaroyl-CoA (Adapté de Liangyou Rui, *Compr Physiol.* 2014).

La lipogenèse se poursuit par l'élongation des palmitates en FFA plus longs. L'acide palmitique est rallongé par des membres de la famille des élongases d'acides gras sous forme d'acyl-CoA (Elovl) dans le RE pour générer des acides gras à longue chaînes (LCFA) (chaîne à plus de 18 carbones). La suppression d'Elovl6 protège contre la stéatose hépatique et de l'inflammation du foie chez les souris nourries avec un régime alimentaire athérogène riche en graisses (AHF); inversement, la surexpression spécifique d'Elovl6 dans le foie augmente la stéatose hépatique induite par l'AHF et ainsi qu'une fibrose hépatique (Matsuzaka et al., 2012).

Les LCFA nouvellement formés peuvent être désaturés par des enzymes membranaires du RE appelées « désaturases » de stéaroyl-CoA (SCD), pour former des LCFA mono- et poly-insaturés pour ainsi augmenter le nombre de types de FFA présent. La suppression spécifique du SCD1 dans les hépatocytes protège contre l'obésité et la stéatose hépatique induits par une diète riche

en glucides, mais pas par une diète riche en gras (Miyazaki et al., 2007). Les produits de SCD1, en particulier l'oléate, semblent être un important régulateur du métabolisme du glucose et des lipides dans le foie (Miyazaki et al., 2007). La lipogenèse est contrôlée en grande partie grâce à la régulation transcriptionnelle des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse. De nombreux régulateurs transcriptionnels ont été identifiés pour activer ces gènes. De nombreux régulateurs régulent également l'expression de gènes supplémentaires qui sont impliqués dans la régulation de l'absorption, le trafic et/ou le stockage des lipides. Le ChREBP se lie et active le promoteur de la pyruvate kinase hépatique, l'enzyme clé de la glycolyse (Yamashita et al., 2001). Il active aussi certains gènes lipogéniques tels que les enzymes maliques, ACL, ACC, FAS, SCD1, et Elovl5 (Iizuka et al., 2004). Le ChREBP est phosphorylé et inhibé par la PKA et déphosphorylé et activé par le PP2A (Kawaguchi et al., 2001). Le glucagon stimule la phosphorylation de ChREBP (dans le foie) sur la Ser 196 en activant la voie AMPc/PKA ce qui mène à son exportation vers le noyau et l'inactive (Denechaud et al., 2008; Dentin et al., 2012). Le glucose est le principal activateur du ChREBP. Une fois oxydé, le glucose peut générer du xylulose-5-phosphate à travers la voie des pentoses phosphates. Le xylulose-5-phosphate active la PP2A qui déphosphoryle le ChREBP, favorisant ainsi sa translocation nucléaire et son activation (Kabashima et al., 2003). Les niveaux de ChREBP sont très élevés chez des souris obèses et une délétion génétique du ChREBP ou une inhibition spécifique au niveau hépatique mènent à une diminution de la lipogenèse et la stéatose hépatique chez des souris *ob/ob* (Dentin et al., 2006; Iizuka et al., 2006).

Les membres de la famille des SREBP (SREBP-1a, -1c et -2) sont les principaux régulateurs du métabolisme des lipides (Horton et al., 2002). SREBP-1c et SREBP-2 sont exprimées abondamment dans le foie (Horton et al., 2002). SREBP-1c active les gènes qui contrôlent la synthèse des acides gras et des TG, et SREBP-2 active les gènes qui contrôlent la biosynthèse du cholestérol (Horton et al., 2002). SREBP-1b favorise à la fois la synthèse des acides gras et du cholestérol (Horton et al., 2002). Les LXR (α et β) forment des hétérodimères avec le récepteur rétinoloïde X (RXR) pour activer leurs gènes cibles (Calkin and Tontonoz, 2012). LXR active la synthèse *de novo* des acides gras (Calkin and Tontonoz, 2012), se lie directement au promoteur du SREBP1 et augmente l'expression de SREBP-1c (Repa et al., 2000; Schultz et al., 2000) et stimule aussi l'expression du ChREBP (Cha and Repa, 2007). Les SREBPs font partie des protéines membranaires du RE. Pour être activées, les SREBPs sont transloquées au niveau du

Golgi et clivées séquentiellement par les protéases SIP1 et SIP2 (Horton et al., 2002). Un stress du RE, au niveau hépatique par exemple, favorise le clivage protéolytique du SREBP-1c et par conséquent son activation, augmentant ainsi la lipogenèse (Kammoun et al., 2009). Des niveaux faibles de cholestérol stimulent aussi le SREBP dans les hépatocytes (Horton et al., 2002). Aussi, l'AMPK phosphoryle le SREBP-1c sur la Ser 372 et inhibe le clivage protéolytique et la translocation nucléaire du SREBP-1c, supprimant ainsi la lipogenèse hépatique (Li et al., 2011). SIRT1 désacétyle et inhibe le SREBP-1c, ce qui supprime aussi la lipogenèse dans le foie (Ponugoti et al., 2010; Walker et al., 2010). Le PGC-1 β est un co-activateur des SREBPs et stimule la lipogenèse hépatique (Lin et al., 2005). Un knock-down de PGC-1 β au niveau hépatique diminue l'expression des gènes lipogéniques et améliore la stéatose hépatique induite par le fructose (Nagai et al., 2009).

Les niveaux de PPAR γ dans le foie sont faibles chez les souris normales et augmentent avec l'obésité (Moran-Salvador et al., 2011). Le PPAR γ hépatique stimule l'expression de nombreux gènes qui contrôlent l'absorption et le trafic des acides gras, et la biosynthèse des TG dans le foie (Lee et al., 2012). PPAR γ stimule également l'expression de *Cidec*, une protéine des gouttelettes lipidiques (Matsusue et al., 2008). Une délétion spécifique du PPAR γ au niveau hépatique, supprime l'expression de plusieurs gènes lipogéniques et prévient la stéatose hépatique chez des souris nourries avec une diète riche en gras (Moran-Salvador et al., 2011). Comme PPAR γ , PPAR δ active aussi des gènes de la lipogenèse, et l'expression spécifique du PPAR δ dans le foie augmente les niveaux de lipides dans le foie des souris (Liu et al., 2011).

1.6.3 Régulation du métabolisme énergétique par les voies hormonales et neuronales

Insuline et résistance à l'insuline

Plusieurs hormones régulent le métabolisme énergétique dans le foie. L'insuline inhibe de manière importante la gluconéogenèse et la suppression spécifique du récepteur à l'insuline dans les hépatocytes augmente la gluconéogenèse hépatique chez la souris, ce qui entraîne une hyperglycémie et une intolérance au glucose (Michael et al., 2000). Les récepteurs à l'insuline se lient aux IRS1 et IRS2 et les phosphorylent sur des résidus tyrosine (Saltiel and Kahn, 2001; White, 2002). Une fois phosphorylée sur la tyrosine, les IRS activent la voie PI3-kinase/Akt (Saltiel and Kahn, 2001; White, 2002). Par la suite, Akt phosphoryle et inactive FOXO1 dans le

foie, supprimant ainsi la gluconéogenèse (Haeusler et al., 2010; Matsumoto et al., 2007; Nakae et al., 2001; Puigserver et al., 2003). En revanche, la MAPK phosphatase-3 (MKP-3) déphosphoryle le FOXO1 sur le résidu sérine 256 et favorise la translocation nucléaire de FOXO1, qui active les gènes de la gluconéogenèse et augmente l'hyperglycémie (Wu et al., 2010).

Le Glucagon

Le glucagon, une hormone sécrétée par les cellules α du pancréas, et la sécrétion de glucagon est augmentée à jeun et pendant l'exercice (Wasserman et al., 1989). Un appauvrissement génétique des cellules α pancréatiques provoque un déficit en glucagon, ce qui améliore la tolérance au glucose et diminue l'expression des gènes gluconéogéniques, la production hépatique du glucose (HGP) et la glycémie à jeun (Hancock et al., 2010). La suppression totale du récepteur du glucagon diminue les taux de glycémie et améliore la tolérance au glucose (Gelling et al., 2003; Parker et al., 2002). Les Souris knock-out du récepteur du glucagon résistent à l'obésité induite par l'alimentation, à l'intolérance au glucose, et à la stéatose hépatique (Conarello et al., 2007). Les récepteurs de glucagon, membres de la famille des récepteurs couplés à la protéine G, activent la voie AMPc-PKA (Jiang and Zhang, 2003). La PKA phosphoryle et active la protéine CREB qui stimule la gluconéogenèse hépatique. Le glucagon aussi stimule la libération de Ca^{2+} du RE des hépatocytes via la phosphorylation du récepteur de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3R) médiée par la PKA (Wang et al., 2012). Le Ca^{2+} active la CaMKII qui à son tour favorise la translocation nucléaire de FOXO1 (Ozcan et al., 2012).

Autres régulateurs hormonaux

Plusieurs hormones gastro-intestinales, y compris le GLP-1 et le GIP, sont bien connues pour réguler la HGP indirectement en stimulant la sécrétion d'insuline. Des dérivés de ces hormones (liraglutide ou exendin-4) (Nauck and Meier, 2005) sont également en mesure d'agir directement sur les hépatocytes (Sharma et al., 2011). Les acides biliaires stimulent l'expression et la sécrétion de FGF15/19 à partir de l'intestin grêle en activant le FXR (farnesoid X receptor) (Inagaki et al., 2005). Les niveaux de FGF15/19 augmentent après l'ingestion d'aliments (Potthoff et al., 2011). Le FGF15/19 favorise la déphosphorylation de CREB et inhibe la capacité de CREB d'activer les gènes de PGC-1 α et de la G6P phosphatase, supprimant ainsi la gluconéogenèse (Potthoff et al., 2011).

L'intestin est connecté anatomiquement au foie via la veine porte. La plupart des nutriments absorbés, des hormones gastro-intestinales, et les métabolites gastro-intestinaux vont directement au foie. Certains métabolites du microbiome intestinal sont également dirigés vers le foie par la circulation de la veine porte (Henao-Mejia et al., 2012). Ces molécules biologiquement actives régulent directement le métabolisme du glucose et des lipides dans le foie.

Modulation neuronale

Le tractus gastro-intestinal régule également le métabolisme du foie indirectement par l'intermédiaire du système nerveux central (SNC). En réponse à l'ingestion d'aliments, des signaux de nutriments, codés par des capteurs de lipides dans le duodénum, sont transmis par des fibres afférentes du nerf vague intestinal vers le noyau du faisceau solitaire (NTS) dans le cerveau postérieur (Wang et al., 2008). Le NTS à son tour supprime la HGP via le nerf vague (Wang et al., 2008). La cholécystokinine (CCK) intestinale active les récepteurs CCK-A dans les fibres afférentes intestinales et diminue la HGP via l'axe intestin-cerveau-foie (Cheung et al., 2009).

Le SNC régule aussi le métabolisme énergétique du foie directement via le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux parasympathique qui innervent directement le foie. Le circuit neuronal dans l'hypothalamus et le cerveau postérieur régule l'activité de la plupart des organes internes, y compris le foie, et maintient l'homéostasie interne (Stanley et al., 2010). Le SNS stimule la HGP et la mobilisation d'énergie pour les tissus extra-hépatiques, alors que le système parasympathique supprime l'action du SNS et inhibe la HGP et favorise le stockage de nutriments dans le foie.

L'insuline a aussi une action sur le foie via l'hypothalamus. L'insuline active ses récepteurs au niveau des neurones hypothalamiques pour supprimer la HGP (Obici et al., 2002a; Obici et al., 2002b). La signalisation d'insuline dans l'hypothalamus favorise la production d'IL-6 hépatique qui à son tour active de façon paracrinienne la STAT3 et supprime la gluconéogenèse dans le foie (Inoue et al., 2006). La suppression spécifique du récepteur à l'insuline dans les neurones exprimant l'AgRP bloque la capacité de l'insuline centrale à supprimer la HGP (Konner et al., 2007). La leptine, une adipokine, régule également le métabolisme énergétique du foie en plus de contrôler la prise alimentaire et le poids corporel via le SNC (Morris and Rui, 2009). L'administration centrale de la leptine inhibe la glycogénolyse, la gluconéogenèse, et l'expression de la G6P phosphatase et de PEPCK-C dans le foie (Buettner et al., 2006).

1.6.4 Maladies du foie gras non alcooliques

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est actuellement la maladie chronique du foie la plus courante dans le monde occidental (Browning et al., 2004), particulièrement chez les patients atteints d'obésité et de diabète. Le terme "NAFLD" est utilisé pour décrire une affection caractérisée par une accumulation excessive de graisses dans le foie sous forme de TG (stéatose) (>5% des hépatocytes sont atteints à l'histologie). Un sous-groupe de patients avec NAFLD présente également des lésions des cellules hépatiques ainsi qu'une inflammation en plus d'un excès de graisses (stéato-hépatite). Cette dernière situation, appelée stéato-hépatite non alcoolique (NASH), est quasi-impossible à distinguer histologiquement de la stéatohépatite alcoolique (SHA) (World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, 2016). La NASH est une source de préoccupation en raison de la progression potentielle vers les complications d'une cirrhose du foie (Browning et al., 2004) et d'un carcinome hépatocellulaire (Cohen et al., 2011).

La stéatose hépatique résulte d'un déséquilibre entre l'absorption et la synthèse des FFA (entrée) et l'oxydation des FFA et la sécrétion de TG dans les VLDL (sortie). Une balance positive mène à une accumulation de graisse sous forme de TG et de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Les TG hépatique proviennent de trois sources: (i) des graisses alimentaires (emballés dans les chylomicrons riches en TG); (ii) la lipogenèse *de novo*, et (iii) la lipolyse du tissu adipeux périphérique. La RI et l'obésité sont associés à une augmentation de la quantité de FFA à destination du foie suite à une augmentation de la lipolyse dans les adipocytes (Mittendorfer et al., 2009). Le taux d'absorption des FFA hépatique semble ne pas être régulé et proportionnelle aux concentrations plasmatique des FFA (Wahren et al., 1984). Il existe 3 destinations pour les FFA captés par les hépatocytes: (i) leur oxydation dans les mitochondries afin de produire de l'ATP; (ii) la ré-estérification en TG et leur stockage dans des gouttelettes lipidiques; ou (iii) leur estérification en TG, emballés, et sécrétés sous forme de VLDL.

Dans la stéatose hépatique non alcoolique, des anomalies à la fois dans l'absorption des FFA et dans la lipogenèse ont été rapportés, avec une lipolyse périphérique accrue, une lipémie postprandiale et des concentrations de FFA élevées, ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* (Browning and Horton, 2004; Cohen et al., 2011; Fabbrini et al., 2010). De manière intéressante, les taux d'oxydation des FFA (Kohjima et al.,

2007; Kotronen et al., 2009) et la sécrétion des VLDL (Adiels et al., 2006; Fabbrini et al., 2008) semblent être augmenté dans ces patients (Choi and Ginsberg, 2011). Cependant, l'exportation des VLDL en excès ne suffit pas pour compenser l'entrée excessive des FFA et il en résulte nettement une stéatose. En fait, une étude réalisée par Fabbrini et al. (Fabbrini et al., 2008) a montré que l'augmentation de la sécrétion hépatique de VLDL atteint un niveau de plateau, au-delà duquel on remarque une augmentation des niveaux de TG intrahépatiques, car ils ne pourront plus être exportés sous forme de VLDL. L'étape limitante à laquelle les hépatocytes perdent la capacité de soutenir la sécrétion des lipoprotéines est actuellement méconnue. La stéatose est un mécanisme d'adaptation compensatoire cliniquement silencieux. Cependant, il affecte des fonctions cellulaires et moléculaires sensibilisant ainsi le foie à toutes sortes de troubles supplémentaires comme la RI (Savage et al., 2006). Une fois que l'équilibre est basculé, le résultat est une interaction complexe et méconnue entre les hépatocytes, cellules étoilées du foie, et des leucocytes dans le foie, qui conduit à la NASH et au développement de l'apoptose, l'inflammation et la fibrose du foie.

La raison de la progression vers la NASH n'a pas été complètement définie mais l'inflammation systémique (augmentation de TNF- α et de l'IL-6 et la diminution de l'adiponectine), le stress oxydatif et du RE, et un dysfonctionnement mitochondrial jouent clairement un rôle dans la pathogenèse de la maladie (Browning and Horton, 2004; Feldstein, 2010). La question reste de savoir quels facteurs déclenchent ces voies communes. Le type de lipides accumulés joue un rôle important dans la lipotoxicité. Une accumulation de TG en soi ne semble pas être nocive, toutefois, l'excès de FFA (Li et al., 2009; Yamaguchi et al., 2007) et de cholestérol libre (Mari et al., 2006; Teratani et al., 2012; Wouters et al., 2008) peuvent entraîner des effets néfastes dans les hépatocytes. La RI, reflétée par l'hyperinsulinémie, affecte clairement le métabolisme des lipides (Choi and Ginsberg, 2011), en plus de promouvoir davantage l'inflammation et la fibrose (Ota et al., 2007). Plus récemment, le microbiote intestinal a été impliqué à la fois dans la pathogenèse de la stéatose hépatique non alcoolique et dans la progression vers le NASH via des troubles métaboliques et des effets pro-inflammatoire (Abu-Shanab and Quigley, 2010).

1.7 Rôle de la Glycérol-3-phosphate phosphatase (G3PP) dans le métabolisme énergétique

Le Gro3P est un organophosphate provenant de la phosphorylation du glycérol par la glycérokinase. Le Gro3P peut être aussi synthétisé en réduisant le DHAP, provenant de la glycolyse, par la GPDH. Le DHAP et donc le Gro3P peuvent aussi être synthétisés à partir des acides aminés et des intermédiaires du cycle de Krebs via la glycéronéogenèse (Jin et al., 2013) (Figure 13). Dans le foie, le Gro3P peut être synthétisé à partir de la phosphorylation du glycérol provenant de la lipolyse des tissus périphériques tels que le tissu adipeux. Après cette phosphorylation par la glycérokinase, le Gro3P peut se diriger soit vers la glycolyse soit la gluconéogenèse dépendant du statu métabolique. Le Gro3P est aussi le point de départ dans la synthèse *de novo* des glycérolipides. Chez les eucaryotes, il est d'abord acylé sur la position *sn*-1 par une des glycérol-3-phosphate acyltransférases (GPAT), une enzyme de la membrane mitochondriale ou du RE; un autre groupe acyle est ensuite ajouté sur la position *sn*-2 synthétisant ainsi l'acide phosphatidique (PA) (Figure 7).

Deux voies peuvent conduire à la production du glycérol. Tels que discuté précédemment, le Gro3P peut entrer dans le cycle GL/FFA afin de produire des TG et la plupart des phospholipides (PL), qui sont tous construits sur l'échafaud d'une molécule de glycérol. Le glycérol est alors libéré à la suite de la catalyse des glycérolipides par les lipases (lipolyse complète) (Figure 7). Une deuxième voie directe pourrait impliquer une seule enzyme, une glycérol-3-phosphate phosphatase (G3PP), qui déphosphorylerait directement le Gro3P pour libérer le glycérol (Figure 13). La déphosphorylation directe du Gro3P en glycérol par une G3PP est une voie bien connue dans un nombre limité d'espèces qui accumulent de grandes quantités de glycérol en réponse à des facteurs de stress abiotiques (Ditlecadet and Driedzic, 2014). À ce jour et avant cette thèse, cette enzyme a été identifiée de façon formelle dans les levures, *Saccharomyces cerevisiae* (Norbeck et al., 1996) et *Candida albicans* (Fan et al., 2005); les bactéries, *Bacillus licheniformis* (Skraly and Cameron, 1998); et les plantes, *Arabidopsis thaliana* (Caparros-Martin et al., 2007). La G3PP n'a jamais été identifiée chez les eucaryotes supérieurs, et jusqu'à très récemment, l'existence réelle de cette voie n'avait même jamais été suggérée.

1.7.1 G3PP chez les bactéries et levures

Les organismes qui produisent du glycérol pour se protéger contre les effets de l'environnement se trouvent dans tous les règnes de la vie. Certaines levures (Hohmann, 2002) produisent du glycérol pour atteindre l'équilibre osmotique dans des environnements hyper-

osmotiques ou atténuer le stress de dessiccation. Une voie commune pour produire le glycérol comprend les enzymes GPDH et G3PP (Figure 13). Ces enzymes responsables des activités GPDH et G3PP ont été identifiées dans la plupart des organismes inférieurs producteurs de glycérol, y compris les bactéries et les levures.

Skrally and Cameron (Skrally and Cameron, 1998) ont identifié une enzyme dans une bactérie appelée *Bacillus licheniformis*, la D- α -glycérophosphatase. L'enzyme est hautement spécifique pour le D- α -glycérophosphate, effectuant peu ou pas d'hydrolyse du L- α - ou β -glycérophosphate ou d'autres composés similaires. Toutes les autres α -glycérophosphatases hydrolysent préférentiellement l'isomère L. Les produits de la réaction de la D- α -glycérophosphatase sont le glycérol et le phosphate inorganique. L'enzyme est un monomère avec une masse moléculaire apparente d'environ 25 kDa. Comme avec la plupart des phosphatases, il faut un magnésium (Mg^{2+}) bivalent pour son activité, mais contrairement aux autres phosphatases acides et alcalines non spécifiques, son pH optimal est environ neutre. Son K_m pour le D- α -glycérophosphate, en présence de 1 mmol/l de Mg^{2+} est de 4,3 mmol/l. La D- α -glycérophosphatase est produite pendant les périodes de fermentations du *Bacillus licheniformis*, même en présence des niveaux élevés de phosphate inorganique et serait donc capable de catalyser la formation du glycérol. Les caractéristiques de la D- α -glycérophosphatase de *B. licheniformis* sont similaires à ceux des L- α -glycérophosphatases bactériennes et de levure, ce qui suggère que la D- α -glycérophosphatase peut être l'enzyme clé dans la formation du glycérol dans la fermentation de *B. licheniformis*.

Récemment, une étude a découvert un autre type de G3PP chez *Mycobacterium tuberculosis* (Larrouy-Maumus et al., 2013). Cette nouvelle G3PP bactérienne, que les auteurs ont appelée Rv1692 fait partie d'une superfamille des haloacides dehalogenase (HAD) de type hydrolase, qui contient un grand nombre d'enzymes qui partagent un domaine central très conservé et catalysent plusieurs types de réactions (par exemple, les phosphatases, les phosphatases, les phosphomutases, et les dehalogénases) (Allen and Dunaway-Mariano, 2004, 2009; Lahiri et al., 2004). Afin d'évaluer directement la spécificité au substrat de la Rv1692, des mesures cinétiques ont été effectuées en utilisant une variété de substrats. Parmi tous les substrats testés, Rv1692 catalyse préférentiellement l'hydrolyse du Gro3P et n'a montré aucune activité envers le D-glycéraldéhyde-3-phosphate ou le DHAP, deux métabolites étroitement liés au Gro3P. Par conséquent, Rv1692 a effectivement une activité G3PP dans la *Mycobacterium tuberculosis*. De plus, les auteurs ont suggéré l'implication du Rv1692 dans l'une des fonctions métaboliques

importante chez ce type de bactéries, la synthèse et le catabolisme des intermédiaires du cycle GL/FFA.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux isoformes ont été identifiées, G3PP1/RHR2 et G3PP2/HOR2. Les mutants de ces deux gènes, manquent d'activité G3PP et produisent de faibles quantités de glycérol comparés aux types sauvages, suggérant fortement le rôle essentiel de cette voie dans la synthèse du glycérol chez cette espèce (Pahlman et al., 2001).

1.7.2 G3PP chez les plantes

De même que chez les levures, certaines algues (He et al., 2009) produisent du glycérol pour atteindre l'équilibre osmotique pour faire face au stress causé par un environnement hyper-osmotique. *Dunaliella tertiolecta* est une algue verte unicellulaire qui, lorsqu'elle est confrontée à une diminution ou une augmentation du potentiel hydrique du milieu environnant, accumule ou élimine, respectivement, le glycérol pour rétablir l'équilibre osmotique (Ben-Amotz and Avron, 1973). Il existe plusieurs évidences comme quoi la GPDH est le point de départ dans la production du glycérol chez les algues. En effet, une augmentation transitoire de la teneur en Gro3P a été trouvée au moment où la synthèse du glycérol était élevée suite à un choc hyper-osmotique, alors que la teneur en triosephosphate était légèrement diminuée au cours de la même période (Belmans and Van Laere, 1987). En utilisant un dosage enzymatique avec détection de phosphate, une méthode peu sensible à faibles concentrations de substrat, Sussman et Avron (Sussman and Avron, 1981) ont trouvé un K_m pour le Gro3P assez élevé de 2,7 à 8,5 mmol/l, en fonction de la concentration du Mg^{2+} , pour la G3PP de la *Dunaliella salina*. Par contre, Belmans et Van Laere (Belmans and Van Laere, 1988), ont mesuré l'activité G3PP de *Dunaliella tertiolecta* en mesurant la libération du glycérol à partir du L-($U^{14}C$)-Gro3P, une méthode très sensible à des concentrations en dessous du niveau millimolaire *in vivo*. L'activité enzymatique était maximale à pH 7. À ce pH neutre optimum, 0,3 μ mol/l de Gro3P est déphosphorylé par minute et par mg de protéine à une concentration de Gro3P de 0,5 mmol/l. La G3PP était presque complètement inactive lorsque le pH du mélange réactionnel était inférieur à 5 ou supérieur à 9. Ils ont observé un K_m de 0,7 mmol/l pour le Gro3P en absence d'orthophosphate inorganique. Il est important de noter que, selon les auteurs de l'étude, la G3PP est extrêmement sensible à la présence de Ca^{2+} dans le milieu réactionnel. La libération du glycérol à partir du Gro3P a été

significativement inhibée par des concentrations de Ca^{2+} de 1 mmol/l, même en présence de 5 mmol/l de Mg^{2+} .

Deux gènes, codant pour des protéines ayant des activités G3PP, ont été isolés chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Caparros-Martin et al., 2007). AtGpp1 et AtGpp2, présentent une homologie avec des phosphatases à faible poids moléculaire chez la levure, la G3PP1 et G3PP2, respectivement, qui ont une forte spécificité pour le DL-glycérol-3-phosphate. En utilisant une approche de génomique comparative, les gènes correspondants ont été identifiés comme protéines appartenant à la superfamille des HAD avec un poids moléculaire d'environ 33 kDa. Les deux isoformes ont un pH optimal de 7, et un K_m de l'ordre de 3,5 à 5,2 mmol/l. Ces deux gènes sont exprimés au cours du développement dans tous les organes de la plante et l'expression n'est pas affectée par un stress osmotique, ionique ou oxydatif.

1.7.3 G3PP chez les poissons et insectes

Certains poissons (Raymond, 1992) et insectes (Storey et Storey, 2012) produisent du glycérol pour se protéger contre le gel. Les *éperlans* (*Osmerus mordax* Mitchell) produisent de grandes quantités de glycérol en hiver comme antigel (Raymond, 1992). Chez ce poisson, plusieurs évidences suggèrent que le glycérol est produit via la voie GPDH/G3PP. Tout d'abord, le tissu hépatique semble avoir des activités GPDH et G3PP (à pH 7,2) en hiver, et ces activités sont plusieurs fois supérieures à celles de deux autres types de poissons du même environnement qui ne produisent pas de glycérol (Driedzic et al., 1998). Deuxièmement, l'activité G3PP (Ditlecadet and Driedzic, 2014) et l'expression de l'ARNm d'un gène GPDH (Robinson et al., 2011) sont nettement augmentés en hiver. Troisièmement, la production du glycérol est alimentée par le glycogène et non les lipides (Ditlecadet and Driedzic, 2013; Raymond, 1995). Par contre, l'activité de la G3PP du foie d'éperlan a un pH optimal acide, avec seulement environ un tiers de l'activité maximum à pH neutre (Ditlecadet and Driedzic, 2014). Des concentrations élevées en sel augmentent à la fois l'expression de l'ARNm de la G3PP et la production de glycérol, ce qui indique que la G3PP est principalement impliquée dans la production de glycérol en réponse à un stress osmotique (He et al., 2007). Avec le glycogène comme source, deux voies de synthèse de glycérol sont disponibles: la voie GPDH/G3PP et une seconde voie catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphatase (GAPP) et la polyol déshydrogénase. Mais les études suggèrent fortement que la voie GPDH/G3PP est la principale voie de synthèse du glycérol de l'éperlan.

L'activité spécifique de la G3PP mesurée chez l'éperlan est comparable à celles des G3PP recombinantes des *Mycobacterium tuberculosis* et *Arabidopsis* (Raymond, 2015).

1.7.4 Le Glycérol-3-phosphate: métabolite central du métabolisme du glucose et des lipides

Le Gro3P se situe au carrefour des métabolismes du glucose, des lipides et énergétique dans les cellules de mammifères. Le cycle GL/FFA, qui est au centre de l'homéostasie énergétique, interconnecte le métabolisme du glucose et des lipides (Nye et al., 2008; Zechner et al., 2012). Tels que discuté plus haut, le cycle GL/FFA est dérégulé dans l'obésité et le DT2. En situation d'apport excessif de nutriments, en particulier du glucose et des FFA, une bonne partie du glucose est utilisé à travers la formation du Gro3P et son incorporation dans les glycérolipides via le cycle GL/FFA (Peyot et al., 2010; Prentki and Madiraju, 2012).

La synthèse du TG dans le foie est une voie métabolique importante pour le contrôle du métabolisme des lipides et le maintien de l'homéostasie énergétique chez tous les mammifères. Il a été estimé qu'environ un tiers des FFA retirés de la circulation sanguine sont pris par le foie chez les animaux sédentaires (Baker and Schotz, 1967; Bragdon and Gordon, 1958; Olivecrona, 1962). Une fraction importante des FFA issue de la circulation sanguine est convertie en TG qui sont soit stockés dans les hépatocytes ou libérés par le foie dans la circulation sous forme de VLDL. L'estérification des FFA hépatiques (non adipeux) semble représenter ~50% de la ré-estérification des FFA chez les humains adultes après un jeûne de 24h (Reshef et al., 2003). Puisque le Gro3P est un intermédiaire obligatoire dans le processus de synthèse des TG, l'implication du foie dans le contrôle du métabolisme des lipides nécessite une production continue et suffisante de Gro3P par les hépatocytes.

Jusqu'à très récemment, seulement deux voies métaboliques menant à la production du Gro3P dans le foie étaient connues: la phosphorylation directe du glycérol par la glycérokinase, une enzyme qui a une activité considérable dans le foie (Lin, 1977), et la conversion du DHAP, issu de la glycolyse, en Gro3P par la GPDH. Martins-Santos et al. 2007 (Martins-Santos et al., 2007) ont suggéré que le foie peut aussi générer du Gro3P à partir du pyruvate, du lactate et des acides aminés glucogéniques, via la glycéronéogénèse. La présence de cette voie a aussi été suggérée dans le tissu adipeux depuis de nombreuses années (Ballard et al., 1967; Gorin et al., 1969; Reshef et al., 1969; Reshef et al., 2003); cette voie implique la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate, la décarboxylation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate par la PEPCK

cytosolique, et par la suite la production du $\text{G}6\text{P}$ par une inversion partielle de la glycolyse. Une étude chez les femmes suggère qu'après un jeûne de 16h, 10 à 60% des TG plasmatiques provient du pyruvate, suggérant que la glycéronéogenèse peut jouer un rôle important dans la régulation de la production des TG et VLDL chez l'homme (Kalhan et al., 2001).

1.8 Problématiques et hypothèses du projet de thèse

1.8.1 Problématique I : glucodétoxication et signalisation du glucose pour la sécrétion d'insuline

De nombreuses études se sont intéressées aux concepts de glucotoxicité, lipotoxicité et glucolipotoxicité, afin d'expliquer le dysfonctionnement et la perte de cellules β observée dans le DT2 (Prentki and Nolan, 2006; Unger and Zhou, 2001). En réponse à un excès de nutriments calorigéniques, plusieurs types cellulaires devraient posséder des mécanismes de protection contre la toxicité induite par les nutriments (*voir section 1.4.*). Si de nombreux mécanismes liés à la toxicité des nutriments en excès ont été décrits, on ne sait que peu de choses sur les voies possibles de détoxication des nutriments calorigéniques, d'où le nouveau concept de « glucolipodétoxication » présenté dans cette thèse. Chez plusieurs types cellulaires, les carbones du glucose peuvent être dirigés vers au moins quatre voies métaboliques soit : 1- leur oxydation via la glycolyse (en pyruvate et lactate) et la mitochondrie; 2- vers la formation de glycogène; 3- vers la biosynthèse des FFA et du cholestérol; et 4- vers l'estérification des acides gras et la production de glycérol par le cycle GL/FFA. L'utilisation de ces voies pourrait aussi permettre aux cellules de gérer l'excès de nutriments. Il est raisonnable de penser qu'une exposition chronique à un nutriment ou une combinaison de nutriments en excès, et/ou une altération d'une des voies de détoxication provoquerait l'apparition d'un stress métabolique ou toxicité par l'accumulation intracellulaire de un ou plusieurs métabolites néfastes, se manifestant par une perte de fonction et/ou diminution de la survie cellulaire.

Dans la cellule β , certains indices nous laissent penser que le cycle GL/FFA joue un rôle clé dans la gestion des carbones du glucose et permet leur gluco-détoxication. Le cycle utilise le glycérol-3 phosphate provenant du glucose et le transforme en glycérol via les processus d'estérification et lipolyse. Étant donné que la glycérokinase n'est pas ou peu exprimée dans la cellule β , (MacDonald and Marshall, 2000; Noel et al., 1997) très peu de Gro3P est reformé à partir du glycérol, et donc la majeure partie de ce dernier n'est pas réutilisée par la cellule et est transportée à l'extérieur par des aquaporines. Le cycle permet aussi l'augmentation des niveaux de TG dans les cellules. Ces TG proviennent des processus d'estérification des FFA avec le Gro3P. Par conséquent, avec l'augmentation des concentrations du glucose, l'incorporation des carbones du glucose sous des formes moléculaires plus "inertes" comme les TG, pourrait être un mécanisme possible de détoxication dans la cellule β . En effet, une plus grande capacité des

îlots de Langerhans à accumuler des TG a été associée à une réduction de la cytotoxicité induite par les FFA chez ces îlots (Cnop et al., 2001).

D'autres formes de stockage des carbones du glucose sont aussi envisageables pour diminuer les effets toxiques des nutriments. Par exemple, les carbones du glucose peuvent être dirigés vers la biosynthèse des FFA et leur élongation via les élongases. La cellule β possède une activité faible de l'enzyme FAS mais plusieurs groupes ont montré une augmentation des niveaux de FFA avec une augmentation des concentrations de glucose (Martins et al., 2004; Zhao et al., 2014). Ces FFA peuvent aussi être allongés par une réaction faisant intervenir le malonyl-CoA provenant du glucose par les processus d'anaplérose/cataplérose. Les FFA peuvent être ensuite relâchés par les cellules et/ou utilisés par le cycle GL/FFA pour la fabrication de TG. Ainsi, en plus de la conversion des carbones du glucose via le cycle GL/FFA en glycérol suivi de son élimination par sortie de la cellule et de leur stockage sous forme de TG, nous pensons qu'une gluco-détoxification peut également avoir lieu par la synthèse *de novo*, l'élongation et l'exportation des FFA à l'extérieur des cellules. La synthèse de cholestérol dérivé du glucose et la formation d'esters du cholestérol pourraient également faire partie des voies de glucolipodétoxification. Finalement, le glycogène est une autre forme de stockage des carbones du glucose. Il est concevable que la cellule β puisse accumuler, à des niveaux beaucoup moindres que le foie, du glycogène. Certains groupes ont mis en évidence cette capacité des cellules β (Doherty and Malaisse, 2001; Rasschaert and Malaisse, 2001). Ainsi, il serait intéressant de comparer la formation des différentes voies mentionnées en réponse à des concentrations élevées de glucose dans la cellule β afin d'avoir une estimation des mécanismes possible de détoxification du glucose en excès et de leur importances relatives.

Afin de différencier les voies métaboliques de signalisation impliquées dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose des voies de détoxification, il serait intéressant de comparer les niveaux d'activité de diverses voies métaboliques et la formation des FCMs avec la sécrétion d'insuline en fonction de l'augmentation du glucose extracellulaire. Par exemple, est ce que l'augmentation des niveaux de glycérol, FFA, TG, glycogène, et de cholestérol corréleront étroitement avec les niveaux de SIIG, particulièrement à des concentrations élevée de glucose, ou à des concentrations maximales de glucose pour la SIIG ces métabolites continuent à augmenter avec des concentrations croissante de glucose? Jusqu'à présent, aucune étude

systematique et quantitative sur ces voies métaboliques candidates pour la détoxification de nutriments n'a été réalisée dans la cellule β , et même dans tout autre type de cellules.

Dans cette thèse nous avons également cherché à savoir quelles sont les voies métaboliques et FCM candidats qui corréleront le mieux avec la sécrétion d'insuline à diverses concentrations de glucose, car le protocole lié à la détoxification du glucose permet aussi cet examen intéressant. Comme nous l'avons vu à la *section 1.5.*, plusieurs groupes ont mis en évidence des processus métaboliques impliqués dans le déclenchement ou l'amplification de la SIIG (Henquin et al., 2009; Jitrapakdee et al., 2010; Muoio and Newgard, 2008) et ont identifié des FCMs candidats. Cependant, nous avons réalisé récemment en utilisant une approche de métabolomique ciblée que les conditions expérimentales utilisées dans quasi toutes les études y compris les nôtres, mettaient en évidence des voies et FCMs qui, peut-être, n'ont pas de rôle important pour la SIIG. En effet, durant une expérience typique de SIIG, la stimulation par le glucose augmente des très nombreux métabolites cellulaires et très peu diminuent (Gooding et al., 2016; Guay et al., 2013; Spegel et al., 2011). Ceci est probablement dû à l'utilisation d'un milieu pauvre en nutriments calorigéniques dans les conditions basales pouvant mener à un stress métabolique où toutes les voies métaboliques sont à des niveaux très bas (déplétion nutritionnelle). Lorsque ces cellules sont stimulées avec du glucose, les voies métaboliques sont sollicitées en même temps et leurs métabolites augmentent. Il est donc difficile d'identifier les voies réellement impliquées dans la SIIG et éventuellement impliqués aussi dans les mécanismes de gluco-détoxification dans ces conditions expérimentales. L'utilisation d'un milieu plus enrichi en nutriment dans les conditions basales reflétant davantage les conditions physiologiques devrait permettre de mieux cerner les voies produisant les FCMs important pour la SIIG et celles impliquées dans la gluco-détoxification.

1.8.1.1 Hypothèse I

Il serait possible de discriminer les voies métaboliques impliquées dans la SIIG de celles impliquées dans la gluco-détoxification en comparant les profils d'activité de ces voies avec la SIIG en termes de leur dépendance à la dose de glucose. Plus précisément, lorsque la concentration extracellulaire de glucose est augmentée, l'activité des voies métaboliques et métabolites impliqués dans la sécrétion d'insuline corréleront avec la SIIG c'est à dire qu'elles présentent des doses effectrices (EC50) similaires et sont saturables. En revanche, les voies

métaboliques impliquées dans les processus de gluco-détoxification ne présentent pas de saturation à des concentrations de glucose plus élevées au-delà de l'effet maximal pour la SIIG. À des niveaux élevés de glucose où la SIIG est saturée, nous supposons que les îlots convertissent une partie importante du glucose en glycérol et FFA à longue chaînes, qui sont alors exportés hors de la cellule β , et en des formes plus « inertes » de stockage de nutriments calorigéniques et que la destination principale des carbones du glucose sont les molécules lipidiques.

1.8.1.2 Objectifs I

En utilisant un nouveau milieu de culture riche avec un niveau de base de glucose se rapprochant davantage des niveaux physiologiques (4 mmol/l), plus d'autres nutriments tels que la glutamine et la carnitine pour favoriser l'oxydation des acides gras, nos objectifs étaient de:

- 1) Identifier les voies métaboliques qui corrélerent avec la SIIG de manière glucose dose-dépendante;
- 2) Identifier les voies métaboliques qui sont possiblement impliquées dans la gluco-détoxification en identifiant celles qui ne sont pas saturables à des concentrations élevées en glucose;
- 3) Déterminer la voie métabolique la plus utilisée pour éliminer (gluco-détoxifier) les carbones du glucose;
- 4) Identifier les voies métaboliques et FCM candidats qui corrélerent avec la SIIG dans un milieu de sécrétion plus riche en nutriment mimant davantage des conditions physiologiques, afin de confirmer certains et en exclure d'autres.

1.8.2 Problématique II

Suite au travail de thèse lié à la problématique I, nous avons constaté que la détoxification des nutriments en excès chez la cellule β pourrait impliquer le cycle GL/FFA, le stockage des carbones du glucose sous forme de TG, FFA et glycogène et la libération de métabolites provenant du glucose, en particulier le glycérol qui est abondamment relâché dans le milieu d'incubation des îlots de Langerhans. Les ouvrages de référence de biochimie indiquent que la production de glycérol de cellules des mammifères provient exclusivement de la lipolyse mais le travail de cette thèse a permis la découverte d'une nouvelle voie métabolique de sa production. Au cours du métabolisme du glucose de la cellule β , il a toujours été considéré que la libération

du glycérol et des FFA était dû à la lipolyse des TG, DAG et MAG, elle-même associée à la sécrétion d'insuline étant donné que l'orlistat, un pan-inhibiteur des lipases, inhibe la SIIG et la libération des FFA. Nous avons constaté que la SIIG et l'oxydation du glucose plafonnent à 16 mmol/l glucose alors que la libération du glycérol augmente linéairement jusqu'à 25 mmol/l glucose et paradoxalement, elle n'est pas affectée par l'orlistat au-dessus de 10 mmol/l glucose. Ceci suggère qu'à des niveaux élevés de glucose, le glycérol est produit par un ou des mécanismes autres que la lipolyse. En effet, l'existence d'une glycérol-3-phosphate phosphatase qui pourrait hydrolyser directement le Gro3P, était méconnue chez les cellules des mammifères (Ditlecadet and Driedzic, 2013). L'hydrolyse directe du Gro3P a été envisagée par plusieurs études mais sans toutefois le démontrer directement, en particulier en identifiant une enzyme associée. (Moriyama et al., 2015; Previs et al., 1995; Romero Mdel et al., 2015). Ainsi, chez les mammifères, les seules destinations considérées du Gro3P sont sa conversion en DHAP ou en LPA, le premier intermédiaire de la partie lipogénique du cycle GL/FFA. Cependant, de nombreux microbes (Fan et al., 2005; Larrouy-Maumus et al., 2013; Norbeck et al., 1996) et plantes (Caparros-Martin et al., 2014) expriment une activité G3PP et dans plusieurs cas, le gène responsable a été identifié. Des comparaisons de séquences de gènes codant pour des G3PP bactériennes et de levure avec les génomes humains et de souris nous ont permis de remarquer des homologies significatives avec les gènes murin et humain codant pour la phosphoglycolate phosphatase (PGP).

1.8.2.1 Hypothèse II

La PGP identifiée chez les mammifères, et dont la fonction est mal connue, agit en fait comme une G3PP capable d'hydrolyser le Gro3P en glycérol. Cette enzyme joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme intermédiaire des cellules de mammifères, en particulier la cellule β et hépatiques, en contrôlant le métabolisme du glucose, des lipides et mitochondrial. La G3PP régule la sécrétion d'insuline et la réponse au stress métabolique de la cellule β et contrôle dans le foie la production hépatique de glucose.

1.8.2.2 Objectifs II

Afin de tester notre hypothèse, nous avons travaillé avec l'enzyme humain purifié et utilisé des techniques de la biologie moléculaire pour augmenter ou réprimer l'expression de PGP dans des

cellules INS832/13, des îlots de Langerhans et hépatocytes isolés de rat ainsi que *in vivo* chez le rat pour examiner si :

- 1) PGP est capable d'hydrolyser *in vitro* directement et spécifiquement le Gro3P en glycérol;
- 2) l'activité principale de PGP dans les cellules de mammifères est son activité G3PP;
- 3) PGP joue un rôle clé dans la régulation des métabolismes et signalisations du glucose et des lipides ainsi que dans la réponse à un stress métabolique tel que la glucolipotoxicité.

2. RESULTATS

2.1 ARTICLE 1

Metabolic fate and signaling of glucose and gluco-detoxification pathways in pancreatic β -cells

^{1,3} Yves Mugabo, ^{1,2,4} Shangang Zhao, ¹ Julien Lamontagne, ^{1,2} Anfal Al-Mass, ¹ Marie-Line Peyot, ¹ Erik Joly, ¹ S. R. Murthy Madiraju and ^{1,3} Marc Prentki*

¹Montreal Diabetes Research Center and Centre de Recherche du CHUM, Montréal, Québec, Canada

²Departments of Medicine and Human Genetics, McGill University, Montreal, Québec, Canada

³Departments of Nutrition, Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Montréal, Montreal, Québec, Canada

⁴Current address: UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

Correspondence:

* Dr. Marc Prentki, marc.prentki@umontreal.ca

Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, 900 St-Denis (Viger Tower), Rm R08-412, Montreal, QC H1W 4A4, Canada. Phone: 1-514-890-8000 # 23642.

Keywords:

Glucose metabolism, lipid metabolism, mitochondrial metabolism, metabolomics, pancreatic β -cell, insulin secretion, gluco-detoxification

Short title: Glucose signaling and detoxification in β -cells

Submitted to: JBC

ABSTRACT

Glucose metabolism promotes insulin secretion in β -cells via metabolic coupling factors that are not fully defined. Also chronically elevated glucose causes β -cell dysfunction but little is known about how cells handle excess fuels to avoid toxicity. Here we aimed to determine which among the candidate pathways and coupling factors best correlate with glucose stimulated insulin secretion (GSIS), define the fate of glucose in the β -cell and identify pathways possibly involved in gluco-detoxification. Isolated rat islets were exposed for 1h to increasing glucose concentrations and various pathways and metabolites measured. Glucose oxidation, oxygen consumption and ATP production correlated well with GSIS and saturated at 16 mM glucose. However, glucose utilization, glycerol release, triglyceride and glycogen contents, free fatty acid (FFA) content and release, and cholesterol and cholesterol esters increased linearly up to 25 mM glucose. The main fates of glucose were towards glycerol release and lipid synthesis, in particular FFA, triglycerides and cholesterol, whereas glycogen production was low in comparison. Using targeted metabolomics in INS832/13 cells several metabolites correlate well with GSIS, in particular some Krebs cycle intermediates, malonyl-CoA and the reduction in ADP levels. Overall, the data support a role for accelerated oxidative mitochondrial metabolism, anaplerosis, malonyl-CoA/lipid signaling in β -cell metabolic signaling, and suggest that a lowering in ADP levels play an important role in GSIS. The results also suggest that fuel excess detoxification pathways comprise glycerol and FFA release from the β -cell as well as the diversion of glucose carbons to triglycerides and cholesterol esters.

INTRODUCTION

Insulin secretion by pancreatic β -cells in response to glucose and other nutrients regulates fuel homeostasis (Prentki et al., 2013). Glucose is the main driver for insulin secretion via its intracellular metabolism in the β -cell. Enhanced glucose metabolism results in an elevation of the β -cell ATP/ADP ratio, closure of ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels, depolarization of the plasma membrane, activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels followed by a rise in intracellular Ca^{2+} that triggers insulin exocytosis (Aguilar-Bryan et al., 1995; Ashcroft, 1991; Ashcroft et al., 1984; Henquin, 2011; Straub and Sharp, 2002). However, this classical pathway alone does not explain how other nutrient stimuli such as free fatty acids (Sluse et al.) increase glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Experimental evidence supports the existence of other metabolic processes called K_{ATP} -independent or amplifying pathways that enhance GSIS (Henquin et al., 2009; Jitrapakdee et al., 2010; Muoio and Newgard, 2008).

We have proposed that the glycerolipid/free fatty acid (GL/FFA) cycle regulates GSIS via the production of lipid signaling molecules (Prentki and Madiraju, 2008) and shown recently that monoacylglycerol acts as a metabolic coupling factor (MCF) that amplifies GSIS via activation of the exocytosis protein munc13-1 (Zhao et al., 2014; Zhao et al., 2015). Additional metabolites, derived from glucose metabolism, such as ATP (Ashcroft et al., 1984), malonyl-CoA (Corkey et al., 1989; Prentki et al., 1992), glutamate (Maechler and Wollheim, 1999), mitochondrial GTP (Kibbey et al., 2007), reactive oxygen species (Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007) and NADPH (Ivarsson et al., 2005; MacDonald, 1995) have been proposed to act as MCF for GSIS. However, which among them are of most importance for GSIS remains to be established.

Short-term exposure of β -cells to FFA increases GSIS but chronic exposure to elevated concentrations of FFA results in β -cell dysfunction and apoptosis (El-Assaad et al., 2003). Growing interest has been expressed in the concepts of glucotoxicity (Bensellam et al., 2012), lipotoxicity (Unger and Zhou, 2001), and glucolipotoxicity (Poitout et al., 2010; Prentki and Corkey, 1996) in type 2 diabetes (T2D), and their roles in β -cell failure has been widely studied. However, the question remains as whether the β -cell has mechanisms to protect against such fuel excess toxicity. In response to chronic fuel surfeit, many cells are able to defend themselves against nutrient-induced toxicity. For example, in skeletal and cardiac muscle, insulin normally promotes nutrient uptake and storage. Nonetheless, chronically elevated fuel supply induces insulin resistance (Kraegen et al., 2001; Krebs and Roden, 2004; Tremblay et al., 2007). This is

likely a beneficial adaptive process to prevent tissue dysfunction from fuel overload (Nolan et al., 2015; Nolan et al., 2013). In adipose tissue and liver, excess fuel can be stored as more “inert” triglycerides (TG), and glycogen and TG, respectively. The response of islet β -cells to chronic fuel excess, however, is different. To maintain glucose homeostasis, the β -cell has to continuously sense fuel load, particularly glucose, and respond with precise insulin secretion. β -cells cannot protect themselves by blocking glucose uptake to avoid excess nutrient load, and they have limited capacity to store fuel excess. Thus, β -cell must remove or divert rapidly glucose carbons toward various metabolic pathways in order to continuously maintain glucose flux entering the cell for insulin secretion and to protect from fuel surfeit.

We have proposed that the GL/FFA cycle not only provides lipid signaling MCF for insulin secretion (Nolan and Prentki, 2008; Zhao et al., 2014), but also prevents mitochondrial oxidative stress in β -cell due to fuel-surfeit and provides a means for nutrient detoxification (Nolan et al., 2006b). Of relevance, we estimated that glucose carbon flux through the glycerol backbone of GL accounts for ~25% of the total islet glucose utilization in Zucker Fatty (ZF) rat islets (Nolan et al., 2006a). Thus, this pathway is able to divert significant quantities of glucose entering the cell away from mitochondrial oxidation. Another means is to limit the build-up of potentially harmful lipid intermediates such as lysophosphatidic acid, or to divert FFA from *de novo* ceramide synthesis (El-Assaad et al., 2003), by increasing TG deposition in lipid droplets. In fact, a higher capacity of islets to accumulate TG has been associated with reduced islet FFA induced cytotoxicity (Cnop et al., 2001). However, no systematic examination of such candidate pathways of fuel excess detoxification has been carried out in β -cells. Thus, identification of these pathways, that allow β -cell to cope with fuel surfeit, may prove important for a better understanding of the molecular nature of β -cell metabolic stress and glucolipotoxicity and provide avenues for the treatment of T2D.

We hypothesized that putative fuel detoxification pathways should be active at elevated glucose levels even beyond those concentrations where insulin secretion is maximal. Therefore, one way to identify glucose excess detoxification pathways is to measure metabolic pathways and metabolites at various glucose concentrations and to identify those that still increase beyond maximal concentrations of glucose for GSIS. By doing so, we expected to discriminate between pathways/metabolites implicated in GSIS from those involved, or also involved, in glucose detoxification. To accurately discriminate between these two, we decided to use an enriched

incubation buffer (basal glucose of 4 mM in the presence of 2 mM glutamine (Gln) in rat islets and 2 mM glucose plus 2 mM Gln in INS 832/13 cells) that mimics more closely the physiological milieu in terms of basal nutrient supply. We recently realized that during standard *in vitro* insulin secretion experiment with 0-2.8 mM glucose, β -cells are in fact energy depleted and thus upon glucose stimulation most metabolites are increased (Gooding et al., 2016; Guay et al., 2013; Hasan et al., 2010; Spiegel et al., 2011), making it difficult to discern metabolites that act as MCF from those that increased upon the glucose supply simply because they were depleted due to very low metabolic rate under basal condition.

In the present study, we aimed to: determine which among the candidate metabolic pathways and MCF best correlate with GSIS, define the fate of glucose in the β -cell and identify pathways that may be involved in gluco-detoxification.

RESULTS

Glucose-induced insulin secretion and its correlations with glucose and mitochondrial metabolism and the production of ROS, glycerol and glycogen- In order to better define the fate of glucose metabolism in the β -cell and to distinguish metabolites and pathways involved in GSIS versus others that may also be implicated in the detoxification of excess glucose, we compared the glucose dose dependency of islets for insulin secretion with the profile of various metabolic processes, metabolites and candidate MCF, under the same incubation conditions. Isolated rat islets were incubated for 60 min at 4, 10, 16 and 25 mM glucose for measuring insulin release as well as glucose utilization and oxidation, oxygen consumption, ATP and ROS production, glycerol release and glycogen content. As expected GSIS increased between 4 and 16 mM glucose before reaching a plateau between 16 and 25 mM (Fig 1A). Similarly, glucose oxidation (Fig 1C), oxygen consumption (Fig 1D) and ATP production (Fig 1E) all showed a saturation plateau between 16 and 25 mM. Mitochondrial uncoupling / proton leak did not vary with the glucose concentration (Fig 1F). However, glucose utilization (Fig 1B), glycerol release (Fig 1I) and glycogen content (Fig 1L) did not show such saturation and increased almost linearly between 4 and 25 mM glucose. This suggested that the latter metabolic pathways and molecules (Fig 1B, I, L) are possibly linked to glucose detoxification. In particular, release of glycerol (3-carbon compound) by the islets showed a molar equivalency to the amount of glucose (6-carbon compound) utilized, indicating that at high glucose almost one third of glucose

used gave rise to glycerol, which is released out of the cell. Thus, glucose utilization is measured by the release of labeled H_2O occurring at the enolase step that lies downstream of dihydroxyacetone phosphate in the glycolysis pathway and of its direct derivative glycerol 3-phosphate (Gro3P). Note that Gro3P can be directly hydrolyzed to glycerol by a newly identified Gro3P phosphatase (Mugabo et al., 2016) or esterified to form glycerolipids before being released as glycerol following lipolysis (Prentki and Madiraju, 2012). Also, data showed that glucose utilization was quantitatively much higher than oxidation, which reached a plateau at 16 mM glucose, with a rate of 25 nmol glucose oxidized/ mg protein/h. Thus, glucose utilization is not entirely related to insulin secretion and a significant portion of utilized glucose carbons are likely redirected to other pathways with some possibly linked to fuel excess detoxification.

Previous studies have demonstrated that hyperglycemia-induced intracellular ROS mediates β -cell apoptosis (Gehrmann et al., 2010; Prentki and Nolan, 2006). However, at relatively low concentrations, ROS could be beneficial having signalling roles in various cellular processes (Maechler et al., 2010), including insulin secretion in β -cells. We found that production of superoxide (Fig 1G and J) and hydrogen peroxide (Fig 1H and K) were significantly increased at 10 mM glucose compared to 4 mM in isolated islets but decreased rapidly at higher glucose concentration (16 and 25 mM) suggesting that cellular ROS levels are regulated to prevent potentially “toxic” accumulation (Gehrmann et al., 2010; Maechler et al., 2010). We then examined the importance of the mitochondrial electron transport chain (ETC) in the intracellular ROS generation, by exposing islets to high glucose in the presence of an inhibitors of the ETC or a ROS scavenger (Fig 1J, K). Results showed that ROS scavenger, N-acetylcysteine, lowered the production of superoxide and hydrogen peroxide at elevated glucose, while rotenone, a complex-I inhibitor, increased ROS production, indicating that site I of the ETC is implicated in ROS production. Overall, the results indicate that GSIS correlates with glucose dependent respiration and ATP production and that a major fate of glucose metabolism is glycerol release and to a much lower extent glycogen (see nmols glucose utilization, glycerol release and glycogen).

Glucose linearly increases the production and release of FFA, as well as cellular content of TG and total and esterified cholesterol- Considering that excess glucose carbons can be directed towards cholesterol, FFA and glycerolipid synthesis, we examined the effect of increasing glucose level on the accumulation of these classes of lipids in rat islets. Total FFA content and

release (Fig 2A, B) increased linearly with glucose concentration up to 25 mM glucose. More specifically, the main FFA species that accumulated in islets were myristate (C14:0), palmitate (C16:0), oleate (C18:1) and stearate (C18:0) (Fig 2D). Except myristate, all of these FFA increased linearly with glucose concentration and glucose quantitatively caused the accumulation of long chain saturated FFA. Similar results were obtained for FFA release even though oleate release did not linearly increase with glucose concentration. Furthermore, stearate and palmitate were the predominant FFA species that accumulated in islets and were released in the incubation medium (Fig. 2D, E). Octanoate, decanoate, laureate, palmitoleate, arachidonate and linoleate were also measured but did not show any change after glucose stimulation (not shown). Similarly, TG (Fig 2C), total cholesterol, cholesterol esters and free cholesterol (Fig 2 F-H), all linearly increased with glucose concentration.

A major fate of glucose metabolism in islets is glycerol release and lipid synthesis- As glucose carbons have several cellular fates, we examined the absolute levels of various metabolites compared to glucose utilization following glucose stimulation (Fig 3A & B). To better quantitatively assess pathways possibly involved in excess glucose detoxification, glucose-derived metabolite levels were plotted as net differences between 4 to 16 mM glucose (Fig 3A) and 16 to 25 mM glucose (Fig 3B), assuming that the differences noted beyond 16 mM glucose would reflect candidate pathways involved in gluco-detoxification. Although it is recognized that the assessment is indirect because we did not directly measure metabolic flux derived from glucose carbons with isotope labeling, the measurements of the levels in various metabolites likely largely correspond to glucose derived carbons since glucose was the only exogenous fuel that varied under our experimental condition. Fig 3A and B shows that glycerol release and to a lesser degree total FFA were the two parameters that increased the most in term of nmol/mg protein per hour when glucose concentration was increased from 4 to 16 and 16 to 25 mM, while total cholesterol (the addition of cholesterol esters and free cholesterol) and glycogen were lower in comparison followed by TG content. However, when the data were analyzed in carbon equivalents (see experimental procedures) (Fig 3 C & D) that takes in account the carbon number of each metabolite, total FFA, TG and total cholesterol became significant recipients for the glucose carbons with approximately equivalent accumulation. Nonetheless still glycerol release remained the quantitatively higher metabolite of glucose derived carbons. Thus, an

important fate of glucose metabolism in rat islets is glycerol production and release as well as lipids, in particular total FFA, total cholesterol and TG.

Changes in the levels of metabolites in response to glucose in INS832/13 cells and correlation with GSIS- To enhance our understanding of metabolic signaling of glucose in the β -cell we then used a targeted metabolomics approach to identify the metabolites that best correlate with the dose dependence of GSIS. Various classes of metabolites and candidate MCF were measured by LC/MS-MS in INS832/13 cells in a medium with 2 mM glucose and 2 mM Gln for the basal fuel condition. INS832/13 cells were chosen for this study instead of isolated islets due to measurements sensitivity issues and 2 mM glucose and not 4 mM (islet studies above) because the dose dependency of GSIS in INS832/13 cells is shifted to the left in comparison to islets. Insulin secretion increased with glucose concentration between 2 and 11 mM glucose (Fig 4A) and reached a plateau at 11 mM glucose. The half maximal effect was observed at lower concentrations of glucose in INS832/13 compared isolated islets as reported before (Hohmeier et al., 2000; Lorenz et al., 2013).

All measured glycolysis-related and Krebs cycles intermediates increased in INS832/13 cells in response to elevated glucose concentration (Fig 4). In accordance with a key role of anaplerosis (replenishment of Krebs cycle intermediates) in glucose signaling, several cycle intermediates correlated well with GSIS, in particular citrate, isocitrate, fumarate and malate. Thus, alike for GSIS, their level at 20 mM glucose was not significantly different from that at 11 mM. Also, in accordance with a role of GL/FFA cycling (Prentki and Madiraju, 2012; Prentki et al., 2013) and the Gro3P shuttle (Jitrapakdee et al., 2010) in GSIS, the level of Gro3P correlated with insulin secretion since its concentration at 20 mM glucose was not significantly different from that at 11 mM.

The levels of glutamine, glutamate and acetoacetyl-CoA (Fig 5A,B,F) remained unchanged with increasing glucose concentration. As described before, leucine and alanine levels slightly increased with glucose concentration (Gooding et al., 2016; Huang and Joseph, 2012) (Fig 5D,E). Acetyl-CoA (Fig 5G) levels showed a tendency to increase with glucose concentration. In accordance with the observation that an important fate of glucose in the β -cell is cholesterol, the first intermediate in the pathway of cholesterol biosynthesis, HMG-CoA (Fig 5I), was reduced, perhaps due to HMG-CoA reductase activation due to AMP-kinase inhibition at

elevated glucose (Pepin et al., 2016). We found a significant reduction in aspartate (Fig 5C) levels as a function of glucose, similar to previous reports (Corkey et al., 1989; Guay et al., 2013). Following glucose exposure, malonyl-CoA levels rose markedly (Fig 5H) and correlated well with insulin secretion (Fig 4A), as previously described (Guay et al., 2013).

The increase in NADH upon glucose stimulation was very prominent (Fig 6B), while that of NADPH was modest and did not reach statistical significance (Fig 6D). GSH levels (Fig 6E) rose only at 20 mM glucose, whereas it was unchanged at 11 mM where secretion was maximal (Fig 4A). NAD^+ (Fig 6A) and NADP^+ (Fig 6C) did not vary but there was a decrease in GSSG after glucose stimulation (Fig 6F) and no change in the GSH/GSSG ratio at concentrations of glucose (4 and 11 mM) that promote effective insulin secretion. NADPH and GSH have been proposed to be implicated in the control of insulin exocytosis via thioredoxin and glutaredoxin (Ferdaoussi et al., 2015; Gooding et al., 2016; Ivarsson et al., 2005). The results obtained in our richer medium in term of basal fuels do not give support to the view that the glutathione redox systems regulates GSIS at least in INS cells, although the data do not discount this possibility.

K_{ATP} channel closure via a rise in the ATP/ADP ratio is important for GSIS. In agreement, ATP levels (at least at 4 and 10 mM glucose, (Fig 7C) slightly increased and AMP (Fig 7A) and ADP (Fig 7B) decreased with glucose concentrations. Even though the absolute increase in ATP levels was very modest (Fig 7C), both ADP and AMP fell markedly (Fig 7A and B) thereby significantly altering the ATP/ADP (Fig 7 I) and ATP/AMP (Fig 7 J) ratios and earlier observations indicated that K_{ATP} channel may be more influenced by reduction in ADP levels (Fridlyand et al., 2005) than increase in ATP. Studies have provided evidence for a role for mitochondrial GTP in GSIS (Kibbey et al., 2007). While there was a small increase in total GTP levels (Fig 7F), that includes both the smaller pool of mitochondrial GTP and the larger GTP pool in the cytosol, the precise changes in the mitochondrial pool may not be detectable (Lorenz et al., 2013). GDP and adenosine levels decrease at intermediate glucose levels (Fig 7E and G) whereas GMP (Fig 7D) and cAMP (Fig 7H) levels did not vary. There was a prominent increase in the GTP/GDP ratio (Fig 7 K) at stimulatory concentrations of glucose for insulin secretion.

DISCUSSION

In the present study, we examined using rat islets the metabolic pathways and corresponding metabolites involved in stimulus secretion coupling and possibly glucose detoxification processes and whether these pathways are shared or different. The main fate of glucose in isolated rat islets besides its oxidation appears to be towards formation and release of glycerol and FFA and the synthesis of cholesterol and its esters (mainly free cholesterol) and TG. By contrast, the accumulation of glycogen in response to elevations in glucose is much lower compared to these other metabolites. There is a clear dichotomy in the glucose concentration dependency profiles of GSIS, which showed saturation by 16 mM glucose, as compared to glucose utilization, glycerol release, glycogen synthesis, FFA synthesis and release, and synthesis and storage of TG and cholesterol, which increased linearly up to 25 mM glucose without any indication of saturation. An ideal detoxification pathway is expected to operate continuously with less or no saturation, so that the toxicity due to the excessive amount of substrate is alleviated effectively. In light of this, it can be viewed that major pathways related to glucose metabolism in rat islet that are possibly involved in fuel excess detoxification (Figure 3 D), in the order of quantitative significance, are glycerol release, TG formation and storage, FFA release, cholesterol esters and glycogen synthesis and storage. The rise in FFA and free cholesterol content is significant at high glucose but these may be related more to signaling or toxicity than fuel detoxification. Glucose utilization, which increases linearly with increasing glucose concentration, is reflected in the increase in FFA (cellular and release), total cholesterol and TG. Glycerol release, which also linearly increases with glucose concentration, likely arises primarily from the direct hydrolysis of Glycerol 3-phosphate by the newly discovered glycerol 3-phosphate phosphatase (Mugabo et al., 2016), at least at elevated glucose concentrations. Contribution to glycerol release by glucose-stimulated lipolysis is important only at glucose concentrations < 10 mM (Mugabo et al., 2016). Several studies have also shown changes in TG content (MacDonald et al., 2008; Zhou et al., 1996), FFA content and release (MacDonald et al., 2008; Martins et al., 2004) and cholesterol content (MacDonald et al., 2008) in response to increasing glucose concentrations in islets and also in other cell types (Xue et al., 2010). However, this work is the first islet work to examine in the same setting many pathways, metabolites and candidate MCF, such that they can be quantitatively compared.

Glucose carbons can be directed towards *de novo* biosynthesis of FFA and FFA elongation in various cells including β -cells and this proportion increases with increased glucose

concentrations (Brun et al., 1996; Sandberg et al., 2005). Our results indicate that islets convert a significant amount of glucose to FFA and export nearly 50% of them out of the cell. Stearic and palmitic acids are the predominant FFA that are synthesized and released into the medium. Similar results were obtained by Martins et al. who measured changes of fatty acid composition caused by glucose in pancreatic islets (Martins et al., 2004). Free cholesterol is essential for many cellular functions and membrane fluidity, but has toxic effects when present in excess (Kellner-Weibel et al., 1998; Lu et al., 2011). Toxicity of accumulating cholesterol is normally controlled via its esterification with FFA by acyl-CoA: cholesterol acyltransferase-1 to produce cholesterol esters (CE) (Yokoyama, 2000) and its efflux via ATP-binding cassette transporters-A1 (ABCA1). It has been shown that deletion of ABCA1 and/or ABCG1 genes that facilitate cholesterol efflux from β -cells causes accumulation of total cholesterol and its derivatives and reduced insulin secretion (Brunham et al., 2008; Kruit et al., 2012). We noticed that much of the glucose carbons are directed towards CE and free cholesterol in islets. These results are in accordance with an earlier study by MacDonald et al., who employed labelled glucose and reported that at high glucose approximately 15% of the glucose carbons are incorporated into CE (MacDonald et al., 2008).

Inasmuch as there is a significant correlation between overall glucose oxidation and GSIS in islets, we examined if the formation of any specific glucose oxidation derived product(s) follows the same glucose dose dependence as GSIS and can be accounted as a potential MCF contributor. Thus, production of ATP, needed for K-ATP channel inhibition, follows the same saturation kinetics as GSIS and agrees with the widely accepted role of ATP as an MCF (Prentki et al., 2013). Even though ROS were proposed to be MCFs no such correlation with GSIS was noticed in our results. Interestingly, the decline in ROS levels above 10 mM glucose may be an indication of their detoxification. The decrease in ROS at higher glucose concentration is in accordance with the metabolomics data in INS832/13 cells showing an increase in NADPH and also GSH at high glucose concentration, since NADPH is used by the glutathione redox system to eliminate ROS (Freeman et al., 2006; Wong et al., 2010). Several studies have shown enhanced ROS levels at elevated concentration of glucose in β -cells (Kim et al., 2007; Llanos et al., 2015b; Pi et al., 2007; Sarre et al., 2012) but to our knowledge none so far reported the glucose dose dependence of the effect. Thus, these studies possibly missed the effect of high

glucose levels that we have observed and the “bell shape” of ROS production as a function of glucose levels, particularly for H_2O_2 .

In order to gain further insight into signalling metabolites and possible MCF candidates, we used a targeted metabolomics approach in INS 832/13 cells. Fumarate, malate, citrate/ isocitrate, succinate, and malonyl-CoA levels correlated well with GSIS and thus could be candidate MCF. Thus several studies implicated anaplerosis and citrate/ isocitrate / malate – pyruvate cycles as important pathways and metabolites for GSIS (Jensen et al., 2008; Jitrapakdee et al., 2010; Nolan and Prentki, 2008; Prentki et al., 2013). Citrate cataplerosis generates cytosolic malonyl-CoA, which by inhibiting FFA oxidation (Roduit et al., 2004), was shown to play a role in GSIS. The marked reduction in HMG-CoA with elevated glucose is likely due to the consumption of this metabolite for cholesterol synthesis, which linearly increased with glucose concentration in islets. Dihydroxyacetone-phosphate, Gro3P, pyruvate, lactate, α -ketoglutarate and NADH correlate better with glucose utilization rather than with GSIS. It is interesting to note that a significant amount of cataplerotic metabolites, in particular citrate (Brun et al., 1996; Schuit et al., 1997) and α -ketoglutarate (Yang et al., 2008) can efflux from cells, and thus contribute to excess fuel detoxification. In fact, we previously observed that as much as 20% of the glucose carbons entering glycolysis exit from β -cells in the form of citrate (Farfari et al., 2000). Thus, citrate by virtue of its participation in pyruvate cycling processes and malonyl-CoA production, and by its ability to exit the cell in relatively large amounts, is a common metabolite involved in pathways for GSIS as well as for glucose detoxification. The steady rise in dihydroxyacetone-phosphate and Gro3P with glucose underlies the linear increase in glycerol release, likely through the hydrolysis of Gro3P by glycerol 3-phosphate phosphatase, but may not be directly related to GSIS. However, it is likely involved in glucose-detoxification since we recently reported that knockdown of glycerol 3-phosphate phosphatase in the β -cell enhances apoptosis caused by chronic exposure to elevated glucose (Mugabo et al., 2016). While we noticed a glucose-dependent linear non-saturating increase in pyruvate and lactate in INS832/13 cells, this may not be of significance for gluco-detoxification in primary β -cells, which have very low amounts of lactate dehydrogenase (Sekine et al., 1994).

Krebs cycle and associated pathways generate metabolites and cofactors which play a role in augmenting GSIS (Henquin et al., 2009; Jitrapakdee et al., 2010; Muoio and Newgard, 2008).

The large increase in malate after glucose stimulation accompanied with a decrease in aspartate, is consistent with the idea that ‘malate-aspartate shuttle’ plays an important role in the transfer of NADH across mitochondrial membrane and also in the anaplerotic supply of oxaloacetate in mitochondria, in the form of aspartate. These results are consistent with the initial proposal by Simpson et al. (Simpson et al., 2006) that aspartate is consumed during GSIS and forms the primary non-pyruvate carboxylase derived anaplerotic substrate for the TCA cycle during GSIS. Mitochondrial derived glutamate has been proposed to participate in GSIS, through the action of mitochondrial glutamate dehydrogenase (α -ketoglutarate to glutamate direction) and the rapid accumulation of glutamate within the insulin secretory granules (Maechler and Wollheim, 2001). However, our results indicate unchanged levels of glutamate with increasing glucose concentrations in INS832/13 cells. The result do not support a role of glutamate as MCF but the possibility that there is a specific increase in glutamate levels in insulin granules or changes in glutamate cellular pools without change in total glutamate cannot be ruled out.

Another proposed MCF for GSIS is NADPH, which showed parallel changes with insulin secretion and is consistent with the idea that NADPH or the NADPH/NADP ration is a potential MCF for GSIS (Ferdoussi et al., 2015; Jensen et al., 2008; MacDonald et al., 2005; Reinbothe et al., 2009).

The overall regulation of K_{ATP} channels by adenine nucleotides depends on the net inhibitory effect of ATP on Kir6.2 and the activating effect of MgADP on the SUR1 component of the channel (Drews et al., 2010; Proks et al., 2010). It is interesting to note that in the present study, while the increase in ATP levels at elevated glucose concentrations was rather subtle, the simultaneous decrease in ADP was marked and this probably results in an optimal ATP/ADP ratio that facilitates the closure of K_{ATP} channels with the resultant exocytosis. The data suggest that variations in ADP upon glucose stimulation are more important than those of ATP to modulate K_{ATP} channels and insulin secretion.

In conclusion, the results support the concept that in β -cell some metabolic pathways play a role in fuel excess detoxification. These possible detoxification processes could involve the storage of high energy currencies (TG, glycogen and cholesterol esters) and the extracellular release of metabolites derived from glucose (glycerol, cholesterol and FFA). Furthermore, the data indicate that a major fate of glucose-derived metabolites are glycerol, FFA and cholesterol, and to a lesser

levels TG. Also a comprehensive study of islet metabolism and targeted metabolomics in INS832/13 cells using a richer medium that minimize fuel depletion under basal conditions showed that glucose oxidation, oxygen consumption, ATP production, some citric acid cycle intermediates, malonyl-CoA and a lowering of ADP closely correlated with insulin secretion, whereas glucose usage, glycerol release, glycogen content, FFA content and release as well as TG and cholesterol content increased almost linearly with glucose concentration. By contrast, the dose dependence of GSIS did not correlate well with ATP, cAMP, ROS, and glutamate that have been proposed to act as MCF for insulin secretion. Overall the data support prevailing hypothesis of β -cell metabolic signaling, in particular a role for accelerated oxidative mitochondrial metabolism, anaplerosis, malonyl-CoA/lipid signaling, and suggest that a lowering in ADP levels play an important role in GSIS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Islet isolation and culture—All procedures involving animals were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the CRCHUM. Pancreatic islets were isolated from male Wistar rats from Charles River (St-Constant, QC, Canada) as described before (Lamontagne et al., 2009), by collagenase (type XI from Sigma-Aldrich) digestion of total pancreas. Isolated islets were handpicked under a stereoscope and cultured overnight at 37°C in RPMI 1640 medium with sodium bicarbonate, supplemented with 10% fetal calf serum, 10 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin, at 11.1 mM glucose without β -mercaptoethanol in petri dish before the start of the experiments.

Insulin secretion in isolated islets—Islets were transferred to RPMI 1640 medium with 4 mM glucose for 2h. Then batches of 100 islets were washed in Krebs Ringer buffer-Hepes (KRBH) at pH 7.4 containing 4 mM glucose and 0.5% defatted BSA, and pre-incubated for 45 min in KRBH containing 4 mM glucose, 0.5% defatted BSA, 50 μ M L-carnitine, 2 mM glutamine and various pharmacological agents or DMSO. Islets were then incubated for 60 min in KRBH with 0.5% defatted BSA, 50 μ M L-carnitine, 2 mM glutamine and containing different

concentrations of glucose, in the presence or absence of pharmacological agents. At the end of the incubations media were collected. Total insulin released into medium and total insulin content were determined by radioimmunoassay with a kit (Linco Research, St. Charles, MO) or by AlphaLisa Assay (Perkin Elmer, MA), using human insulin (Sigma-Aldrich) as standard.

Glycerol assay— One hundred freshly isolated rat islets were incubated for 60 min in KRBH as described above at various concentrations of glucose. At the end of the incubation, media were kept to measure glycerol release. A radiometric glycerol assay was used to measure glycerol in the medium as described (Bradley and Kaslow, 1989; Mugabo et al., 2016). The assay is based on glycerol phosphorylation by glycerokinase in the presence of [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (Perkin Elmer, MA).

Determination of free fatty acids— For FFA determinations, isolated rat islets were incubated for 60 min in KRBH at various glucose concentrations as described above. FFA accumulated in the islet cells and released into the medium were extracted separately by a modified Dole-Meinertz extraction procedure (Puttmann et al., 1993). FFA released into the medium were measured using 0.5 ml of incubation media. For cellular FFA content determinations, media were rapidly removed, islets were rinsed once in PBS and immediately frozen in liquid nitrogen. Then the frozen islets were resuspended in 0.5 ml water, taken for extraction, derivitized and measured by HPLC as described before (Zhao et al., 2014).

Islet glucose metabolism— Groups of 20 freshly isolated islets, cultured and preincubated as described for insulin secretion, were incubated at 37°C for 90 min in KRBH, 0.5% defatted BSA containing 0.5 μCi of D-[5- ^3H]glucose (16 Ci/mmol) and 1 $\mu\text{Ci/ml}$ D-[U- ^{14}C]glucose (250 mCi/mmol) (Perkin Elmer), and different concentrations of glucose. Incubation was stopped by the addition of citrate/NaOH buffer (400 mM, pH 4.9) containing antimycin-A (10 μM), rotenone (10 μM), and potassium cyanide (5 mM) as described previously (Massa et al., 2001). Glucose oxidation was measured by following the generation of $^{14}\text{CO}_2$, trapped in potassium hydroxide after 60 min incubation at room temperature. Glucose utilization was determined by measuring the amount of $^3\text{H}_2\text{O}$ (Peyot et al., 2009b).

Islet triglyceride and cholesterol —Triglyceride (Zhou et al., 1996) and cholesterol (Peyot et al., 2010) contents were measured in batches of 100 isolated rat islets.

Oxygen consumption and mitochondrial function—Oxygen consumption was measured at 37°C from isolated rat islets after overnight recovery using an extracellular O₂ flux Seahorse XF24 analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). Islets were seeded at a density of 75 islets/well. After basal respiration measurement for 20 min, glucose levels were elevated to 10, 16 or 25 mM. After incubation for 20 min, oligomycin, rotenone and antimycin were added by three successive injections to assess uncoupled respiration and non- mitochondrial respiration (Mugabo et al., 2016).

Reactive oxygen species determination— Superoxide (O₂^{•-}) levels were measured in dispersed cells from freshly isolated islets (200 islets per determination) that had been incubated at different concentrations of glucose. Superoxide was detected by FACS measurement of hydroethidine oxidation, as described before (Castedo et al., 2002; Rothe and Valet, 1990). Following 40 min incubations, 2.5 μM HE was added, and cells were incubated at 37°C for an additional 20 min prior to analysis of HE-derived red fluorescence (690 nm bandpass filter). For hydrogen peroxide (H₂O₂) measurement, intact rat islets were used and treated as described above and Amplex-Red hydrogen peroxide/peroxidase assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) was used for detection. Amplex-Red reagent (100 μM) was added 20 min prior to the termination of the 60 min incubations, to react with intracellular H₂O₂ and the red-fluorescence oxidation product, resorufin, with excitation and emission maxima of approximately 571 nm and 585 nm, respectively, was measured.

Glycogen content— Islets glycogen content following 60 min incubations was determined as glucose units analyzed fluorometrically using a glycogen assay kit (ab65620, Abcam, Toronto, ON).

Insulin secretion and targeted metabolomics in INS 832/13 cells—Rat insulinoma INS832/13 cells (Hohmeier et al., 2000) (passages 54–63) were cultured at 11.1 mM glucose in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 50 μM β-mercaptoethanol (complete RPMI) at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂, 95% air). Cells were seeded at 4 x10⁵ cells in six well culture

plates for 2 days to reach a 60–70% confluence at the day of treatment. Cells were then pre-incubated in RPMI containing 2 mM glucose, followed by 2 successive incubations in KRBH media, as described under the section above for insulin secretion in isolated islet, except that 2 mM glucose + glutamine was the basal value for glucose. At the end of the 60 min incubation period with different concentrations of glucose, media were rapidly removed and kept for measurement of secreted insulin, and cell metabolism rapidly quenched by transferring culture plates in liquid nitrogen. Metabolites were extracted as described previously (Guay et al., 2013) with the following modifications. Cells were scraped on ice and collected in 675 μ l ice-cold extraction buffer (80% methanol, 13.7 mM ammonium acetate pH 9.0 with 10 μ M [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]-adenosine-5'-monophosphate lithium salt (supplier) as internal standard, transferred into polypropylene tubes and sonicated in a cup-horn sonicator (Q700 sonicator, Qsonica, Newtown, CT) at 150 W for 2 min (cycles of 10 seconds on, 10 seconds off) in an ethanol-ice bath. Cell extracts were centrifuged at 4°C for 10 min at 25,830 x g and supernatants were collected in ice-cold 2 ml polypropylene tubes to which 250 μ l water were added. Polar metabolites were extracted with 1080 μ l of chloroform:heptane (3:1, v/v) by 2 x 10 s vortex followed by 10 min incubation on ice and 15 min centrifugation at 4°C, 12,500 x g. From the upper phase, 600 μ l were collected without carrying out any interface material and transferred into new cold 2 ml polypropylene tubes. These tubes were centrifuged again and 400 μ l supernatant were collected into cold 1.5 ml polypropylene tubes. Samples were frozen in liquid nitrogen and dried in 2 steps: first in a SpeedVac Concentrator for ~2h (Savant; maximal vacuum, no heat) at 4°C to remove most of the methanol; second, by lyophilization for 90 min (FreeZone from Labconco, Kansas City, MO) and then stored at -80°C until used. Samples were reconstituted in 14 μ l of milli-Q water and injections of 3 μ l were performed in duplicate on a LC-ESI-MS/MS system composed of an Agilent 1200 SL (Rancoule et al.) and a triple quadrupole mass spectrometer (4000Q TRAP MS/MS, Sciex). Samples were separated by gradient elution for 12 min on a Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 75 mm, 2.7 μ m column (Agilent Technologies) using mobile phase consisting of an aqueous solvent A (10 mM tributylamine, 15 mM acetic acid, pH 5.20) and an organic solvent B (95% acetonitrile in water, 0.1% formic acid), at a flow rate of 0.75 mL/min. Column oven temperature during the separation was maintained at 40°C. The MS was operated in negative electrospray ionization mode using a turbo ion spray source. Transitions used and

quantifications were described previously (Guay et al., 2013). Peak areas were used for relative quantification of identified metabolites.

Calculation of carbon equivalents in metabolite determination studies—To provide an estimate of the fate of glucose carbons upon increasing concentrations of glucose (Fig 3 C and D) carbon equivalents for the analyzed metabolites were determined by taking in account the carbon content of each metabolite. Briefly, carbon equivalent for glucose utilization was calculated by multiplying the nmols/mg protein/h of glucose used by 6 corresponding to the number of carbon found in glucose ; glycerol has 3 carbons, thus we multiplied the nmols of glycerol released by 3; for FFA, the palmitate (16 carbons) was taken as a benchmark, thus we multiplied the nmols of FFA content and released by 16; for TG, we considered tripalmitin as the reference molecule with 3 palmitate providing 48 carbons (16 carbons X 3) and then added 3 carbons for the glycerol backbone for a total of 51 carbons; glycogen content is expressed as nmols of glucose and therefore we multiplied the nmols of glucose produced by 6; finally for cholesterol contents we considered 27 carbons and for cholesterol esters 45 carbons corresponding to the esterification of an oleate (18 carbons) onto cholesterol. The carbon equivalent values for total cholesterol content correspond to the addition of carbon equivalents of free cholesterol and cholesterol esters.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Metabolomics and Cellular Physiology Core Facilities of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the Montreal Diabetes research Center for performing the metabolite and insulin determinations. This study was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (to M.P. and S.R.M.M.) and fellowships from Fond de Recherche Santé Québec, the department of Nutrition of Université de Montréal, and Diabète Québec (to Y.M.). M.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Metabolism.

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest

Author contributions:

Conceived and designed the experiments: MP, YM, EJ and SRMM. Performed the experiments: YM, SZ, JL, A A-M. Analyzed the data: YM, MLP, EJ, SRMM and MP. Wrote the paper: YM, EJ, SRMM and MP.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Glucose-induced insulin secretion in isolated rat islets and its correlation with various parameters of glucose and energy metabolism. (A) Insulin secretion measured in islets incubated at 4, 10, 16 and 25 mM glucose for 1h. (B) Glucose utilization and (C) oxidation in islets incubated for 1 h with D-[U-¹⁴C] glucose and D-[5-³H] glucose. (D-F) Respiration and mitochondrial function. Oxygen consumption rate, ATP production and proton leak were calculated from individual traces. (G, J) Superoxide (O₂⁻), and (H, K) hydrogen peroxide (H₂O₂) production in dispersed rat islet cells incubated for 1 h. (J and K) show panels G and H data respectively in bar graph with ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine (NAC, 0.4 mM) and the positive controls H₂O₂ (10 μM) and 16 mM glucose (16G) + Rotenone (Rot, 1 μM). (I) Glycerol release and (L) islet glycogen content after 1 h incubation. Means ± SEM of 6-9 islet incubations in 3 separate experiments, except glycogen determinations performed in two experiments.

FIGURE 2. Glucose dose dependently enhances FFA release and causes FFA, triglyceride and cholesterol deposition in isolated rat islets without saturation at concentrations maximal for secretion. (A, B) Cellular content and release of total FFA by islets at 4, 10, 16 and 25 mM glucose. (C) TG content. (D, E) Cellular content and release of different FFA species. (F) Total cholesterol (Total Chol), (G) cholesterol ester (Chol Esters) and (H) free cholesterol (Free Chol) contents. Means ± SEM of 6-9 islet incubations form of 2-3 independent experiments. Incubation time, 1h. C14:0, myristic acid; C16:0, palmitic acid; C18:1, oleic acid; C18:0, stearic acid.

FIGURE 3. A major fate of glucose metabolism in islets is glycerol release and lipid molecules. (A, B) Changes in the levels of various metabolites compared to glucose utilization in isolated islets following glucose stimulation from 4 to 16 mM (A) and from 16 to 25 mM (B). (C, D) Transformation in carbon equivalents, taking in account the number of carbons of each molecule, of the changes in the levels of various metabolites found in A and B following glucose stimulation from 4 to 16 mM (C) and 16 to 25 mM (D). Carbon equivalents were calculated as

described in EXPERIMENTAL PROCEDURES. Incubation time, 1h. Means \pm SEM of 6-12 islets incubations in 2-4 independent experiments.

FIGURE 4. Insulin secretion and its correlation with the levels of glycolysis-related metabolites and citric acid cycle intermediates in response to increasing glucose concentrations in INS832/13 cells. (A) Insulin secretion at 2, 4, 12 and 20 mM glucose. At the end of the 1 h incubation, metabolites were extracted from the cells and analyzed by LC-MSMS. (B) DHAP, dihydroxyacetone phosphate; (C) Gro-3-P, glycerol-3-phosphate; (D) pyruvate; (E) lactate. (F) citrate; (G) isocitrate + citrate; (H) isocitrate; (I) α -ketoglutarate; (J) succinate; (K) fumarate; (L) malate. Means \pm SEM of 12 cell incubations in 4 independent experiments.

FIGURE 5. Changes in the levels of some amino acids and short-chain CoA derivatives in response to increasing glucose concentrations in INS832/13 cells. Experimental conditions are those of figure 4. (A) glutamine; (B) glutamate; (C) aspartate; (D) leucine; (E) alanine. (F) acetoacetyl-CoA; (G) acetyl-CoA; (H) malonyl-CoA; (I) HMG-CoA, hydroxymethylglutaryl-CoA.

FIGURE 6. Effect of increasing glucose concentrations on the level of nicotinamide adenine dinucleotides and glutathione derivatives in INS832/13 cells. Experimental conditions are those of figure 4. (A) NAD^+ , (B) NADH, (C) NADP^+ , (D) NADPH, (E) GSH, reduced glutathione; (F) GSSG, glutathione disulfide; (G) NADH/NAD, (H) NADPH/NADP, (I) GSH/GSSG, (J) DHAP/Gro-3-P, (K) Pyruvate/Lactate.

FIGURE 7. Effect of increasing glucose concentrations on the level of adenine, guanine and cyclic nucleotides in INS832/13 cells. Experimental conditions are those of figure 4. (A) AMP, (B) ADP, (C) ATP, (D) GMP, (E) GDP, (F) GTP, (G) adenosine, (H) cAMP, (I) ATP/ADP, (J) ATP/AMP, (K) GTP/GDP.

REFERENCES

1. Prentki, M., F.M. Matschinsky, and S.R. Madiraju, *Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion*. Cell Metab, 2013. **18**(2): p. 162-85.
2. Henquin, J.C., *The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in beta-cells*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S27-31.
3. Aguilar-Bryan, L., et al., *Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion*. Science, 1995. **268**(5209): p. 423-6.
4. Ashcroft, F.M., D.E. Harrison, and S.J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells*. Nature, 1984. **312**(5993): p. 446-8.
5. Straub, S.G. and G.W. Sharp, *Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion*. Diabetes Metab Res Rev, 2002. **18**(6): p. 451-63.
6. Ashcroft, F.M., *Ca²⁺ channels and excitation-contraction coupling*. Curr Opin Cell Biol, 1991. **3**(4): p. 671-5.
7. Henquin, J.C., et al., *Shortcomings of current models of glucose-induced insulin secretion*. Diabetes Obes Metab, 2009. **11 Suppl 4**: p. 168-79.
8. Jitrapakdee, S., et al., *Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling*. Diabetologia, 2010. **53**(6): p. 1019-32.
9. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 193-205.
10. Prentki, M. and S.R. Madiraju, *Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease*. Endocr Rev, 2008. **29**(6): p. 647-76.
11. Zhao, S., et al., *alpha/beta-Hydrolase domain-6-accessible monoacylglycerol controls glucose-stimulated insulin secretion*. Cell Metab, 2014. **19**(6): p. 993-1007.
12. Zhao, S., et al., *alpha/beta-Hydrolase domain-6 and saturated long chain monoacylglycerol regulate insulin secretion promoted by both fuel and non-fuel stimuli*. Mol Metab, 2015. **4**(12): p. 940-50.
13. Corkey, B.E., et al., *A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(36): p. 21608-12.

14. Prentki, M., et al., *Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 5802-10.
15. Maechler, P. and C.B. Wollheim, *Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 685-9.
16. Kibbey, R.G., et al., *Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion*. Cell Metab, 2007. **5**(4): p. 253-64.
17. Leloup, C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion*. Diabetes, 2009. **58**(3): p. 673-81.
18. Pi, J., et al., *Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1783-91.
19. MacDonald, M.J., *Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion*. J Biol Chem, 1995. **270**(34): p. 20051-8.
20. Ivarsson, R., et al., *Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2132-42.
21. El-Assaad, W., et al., *Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 4154-63.
22. Bensellam, M., D.R. Laybutt, and J.C. Jonas, *The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **364**(1-2): p. 1-27.
23. Unger, R.H. and Y.T. Zhou, *Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover*. Diabetes, 2001. **50 Suppl 1**: p. S118-21.
24. Poitout, V., et al., *Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 289-98.
25. Prentki, M. and B.E. Corkey, *Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?* Diabetes, 1996. **45**(3): p. 273-83.
26. Kraegen, E.W., et al., *The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001. **109 Suppl 2**: p. S189-201.

27. Krebs, M. and M. Roden, *Nutrient-induced insulin resistance in human skeletal muscle*. Curr Med Chem, 2004. **11**(7): p. 901-8.
28. Tremblay, F., et al., *Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance*. Annu Rev Nutr, 2007. **27**: p. 293-310.
29. Nolan, C.J., N.B. Ruderman, and M. Prentki, *Intensive insulin for type 2 diabetes: the risk of causing harm*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2013. **1**(1): p. 9-10.
30. Nolan, C.J., et al., *Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(3): p. 673-86.
31. Nolan, C.J. and M. Prentki, *The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **19**(8): p. 285-91.
32. Nolan, C.J., et al., *Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion*. Diabetes, 2006. **55 Suppl 2**: p. S16-23.
33. Nolan, C.J., et al., *Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling*. Diabetologia, 2006. **49**(9): p. 2120-30.
34. Cnop, M., et al., *Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1771-7.
35. Guay, C., et al., *A role for cytosolic isocitrate dehydrogenase as a negative regulator of glucose signaling for insulin secretion in pancreatic ss-cells*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77097.
36. Hasan, N.M., et al., *Lower succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase (SCOT) and ATP citrate lyase in pancreatic islets of a rat model of type 2 diabetes: knockdown of SCOT inhibits insulin release in rat insulinoma cells*. Arch Biochem Biophys, 2010. **499**(1-2): p. 62-8.
37. Spiegel, P., et al., *Metabolomic analyses reveal profound differences in glycolytic and tricarboxylic acid cycle metabolism in glucose-responsive and -unresponsive clonal beta-cell lines*. Biochem J, 2011. **435**(1): p. 277-84.
38. Gooding, J.R., M.V. Jensen, and C.B. Newgard, *Metabolomics applied to the pancreatic islet*. Arch Biochem Biophys, 2016. **589**: p. 120-30.

39. Mugabo, Y., et al., *Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: Role in metabolism and signaling in pancreatic beta-cells and hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(4): p. E430-9.
40. Prentki, M. and S.R. Madiraju, *Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **353**(1-2): p. 88-100.
41. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1802-12.
42. Gehrmann, W., M. Elsner, and S. Lenzen, *Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12 Suppl 2**: p. 149-58.
43. Maechler, P., et al., *Role of mitochondria in beta-cell function and dysfunction*. Adv Exp Med Biol, 2010. **654**: p. 193-216.
44. Hohmeier, H.E., et al., *Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes, 2000. **49**(3): p. 424-30.
45. Lorenz, M.A., et al., *Metabolome response to glucose in the beta-cell line INS-1 832/13*. J Biol Chem, 2013. **288**(15): p. 10923-35.
46. Huang, M. and J.W. Joseph, *Metabolomic analysis of pancreatic beta-cell insulin release in response to glucose*. Islets, 2012. **4**(3): p. 210-22.
47. Pepin, E., et al., *Pancreatic beta-Cell Dysfunction in Diet-Induced Obese Mice: Roles of AMP-Kinase, Protein Kinase Cepsilon, Mitochondrial and Cholesterol Metabolism, and Alterations in Gene Expression*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0153017.
48. Ferdaoussi, M., et al., *Isocitrate-to-SENPI signaling amplifies insulin secretion and rescues dysfunctional beta cells*. J Clin Invest, 2015. **125**(10): p. 3847-60.
49. Fridlyand, L.E., L. Ma, and L.H. Philipson, *Adenine nucleotide regulation in pancreatic beta-cells: modeling of ATP/ADP-Ca²⁺ interactions*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(5): p. E839-48.
50. Zhou, Y.P., Z.C. Ling, and V.E. Grill, *Inhibitory effects of fatty acids on glucose-regulated B-cell function: association with increased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxidation on glucose metabolism*. Metabolism, 1996. **45**(8): p. 981-6.

51. MacDonald, M.J., et al., *The role of rapid lipogenesis in insulin secretion: Insulin secretagogues acutely alter lipid composition of INS-1 832/13 cells*. Arch Biochem Biophys, 2008. **470**(2): p. 153-62.
52. Martins, E.F., et al., *Changes of fatty acid composition in incubated rat pancreatic islets*. Diabetes Metab, 2004. **30**(1): p. 21-7.
53. Xue, J.H., et al., *High glucose promotes intracellular lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by impairing cholesterol influx and efflux balance*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(1): p. 141-50.
54. Sandberg, M.B., et al., *Glucose-induced lipogenesis in pancreatic beta-cells is dependent on SREBP-1*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **240**(1-2): p. 94-106.
55. Brun, T., et al., *Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling*. Diabetes, 1996. **45**(2): p. 190-8.
56. Kellner-Weibel, G., et al., *Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(3): p. 423-31.
57. Lu, X., et al., *Cholesterol induces pancreatic beta cell apoptosis through oxidative stress pathway*. Cell Stress Chaperones, 2011. **16**(5): p. 539-48.
58. Yokoyama, S., *Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 231-44.
59. Brunham, L.R., et al., *Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 403-8.
60. Kruit, J.K., et al., *Loss of both ABCA1 and ABCG1 results in increased disturbances in islet sterol homeostasis, inflammation, and impaired beta-cell function*. Diabetes, 2012. **61**(3): p. 659-64.
61. Freeman, H., et al., *Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion*. Cell Metab, 2006. **3**(1): p. 35-45.
62. Wong, N., et al., *The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance*. Endocrinology, 2010. **151**(1): p. 96-102.

63. Llanos, P., et al., *Glucose-Dependent Insulin Secretion in Pancreatic beta-Cell Islets from Male Rats Requires Ca^{2+} Release via ROS-Stimulated Ryanodine Receptors*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129238.
64. Kim, W.H., et al., *AICAR potentiates ROS production induced by chronic high glucose: roles of AMPK in pancreatic beta-cell apoptosis*. Cell Signal, 2007. **19**(4): p. 791-805.
65. Sarre, A., et al., *Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 142-50.
66. Jensen, M.V., et al., *Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1287-97.
67. Roduit, R., et al., *A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1007-19.
68. Schuit, F., et al., *Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18572-9.
69. Yang, L., et al., *Metabolomic and mass isotopomer analysis of liver gluconeogenesis and citric acid cycle. I. Interrelation between gluconeogenesis and cataplerosis; formation of methoxamates from aminooxyacetate and ketoacids*. J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 21978-87.
70. Farfari, S., et al., *Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 718-26.
71. Sekine, N., et al., *Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4895-902.
72. Simpson, N.E., et al., *Insights into the role of anaplerosis in insulin secretion: A ^{13}C NMR study*. Diabetologia, 2006. **49**(6): p. 1338-48.
73. Maechler, P. and C.B. Wollheim, *Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 807-12.

74. MacDonald, M.J., et al., *Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E1-15.
75. Reinbothe, T.M., et al., *Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(6): p. 893-900.
76. Drews, G., P. Krippeit-Drews, and M. Dufer, *Electrophysiology of islet cells*. Adv Exp Med Biol, 2010. **654**: p. 115-63.
77. Proks, P., H. de Wet, and F.M. Ashcroft, *Activation of the K(ATP) channel by Mg-nucleotide interaction with SUR1*. J Gen Physiol, 2010. **136**(4): p. 389-405.
78. Lamontagne, J., et al., *Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic beta-cell at submaximal glucose concentrations*. Endocrinology, 2009. **150**(8): p. 3465-74.
79. Bradley, D.C. and H.R. Kaslow, *Radiometric assays for glycerol, glucose, and glycogen*. Anal Biochem, 1989. **180**(1): p. 11-6.
80. Puttmann, M., et al., *Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range*. Clin Chem, 1993. **39**(5): p. 825-32.
81. Massa, M.L., et al., *Changes induced by sucrose administration on glucose metabolism in pancreatic islets in normal hamsters*. J Endocrinol, 2001. **171**(3): p. 551-6.
82. Peyot, M.L., et al., *Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion*. J Biol Chem, 2009. **284**(25): p. 16848-59.
83. Peyot, M.L., et al., *Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass*. Diabetes, 2010. **59**(9): p. 2178-87.
84. Castedo, M., et al., *Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis*. J Immunol Methods, 2002. **265**(1-2): p. 39-47.
85. Rothe, G. and G. Valet, *Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein*. J Leukoc Biol, 1990. **47**(5): p. 440-8.
86. Rancoule, C., et al., *Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice*. Diabetologia, 2013. **56**(6): p. 1394-402.

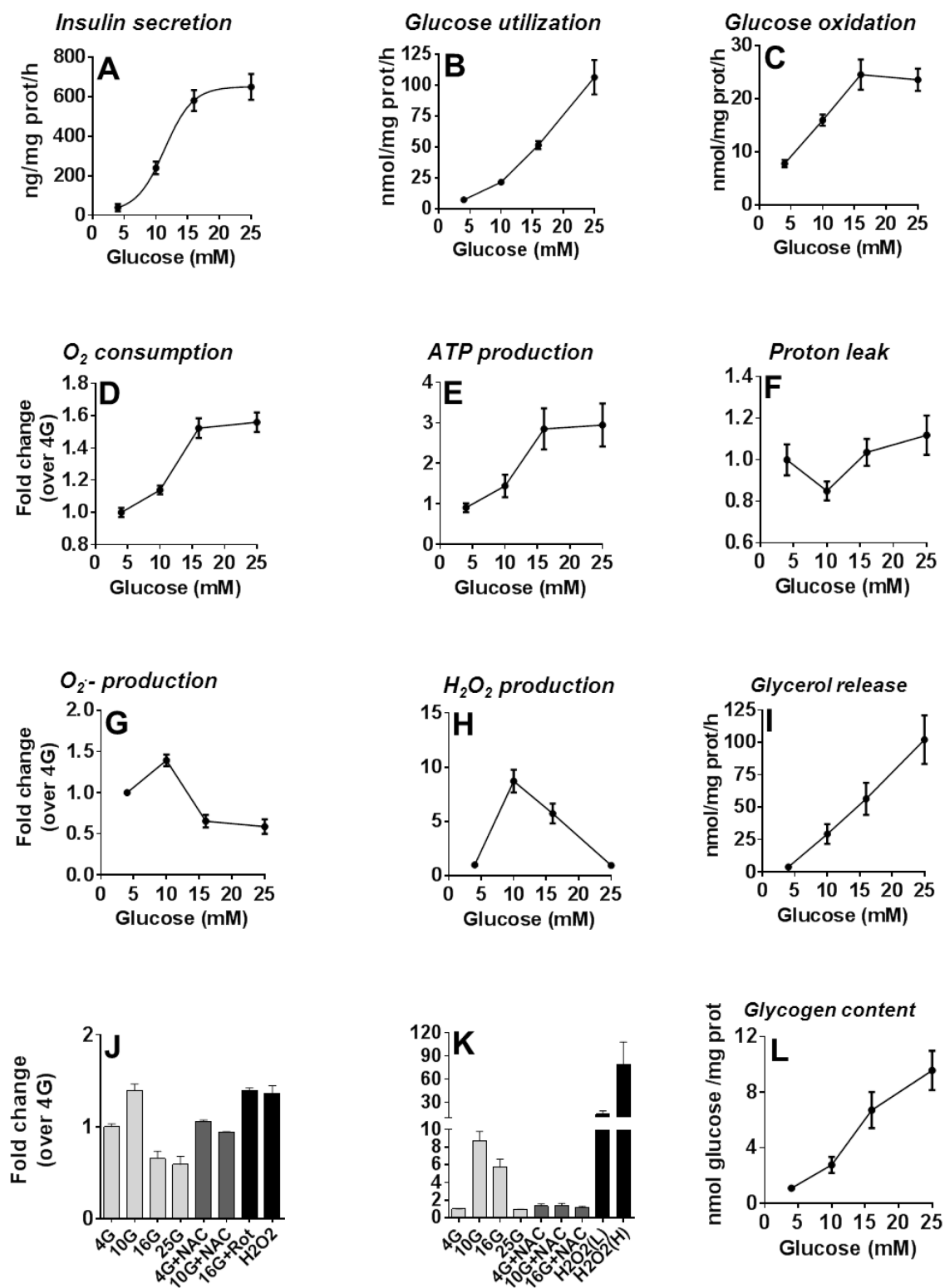
FIGURE 1

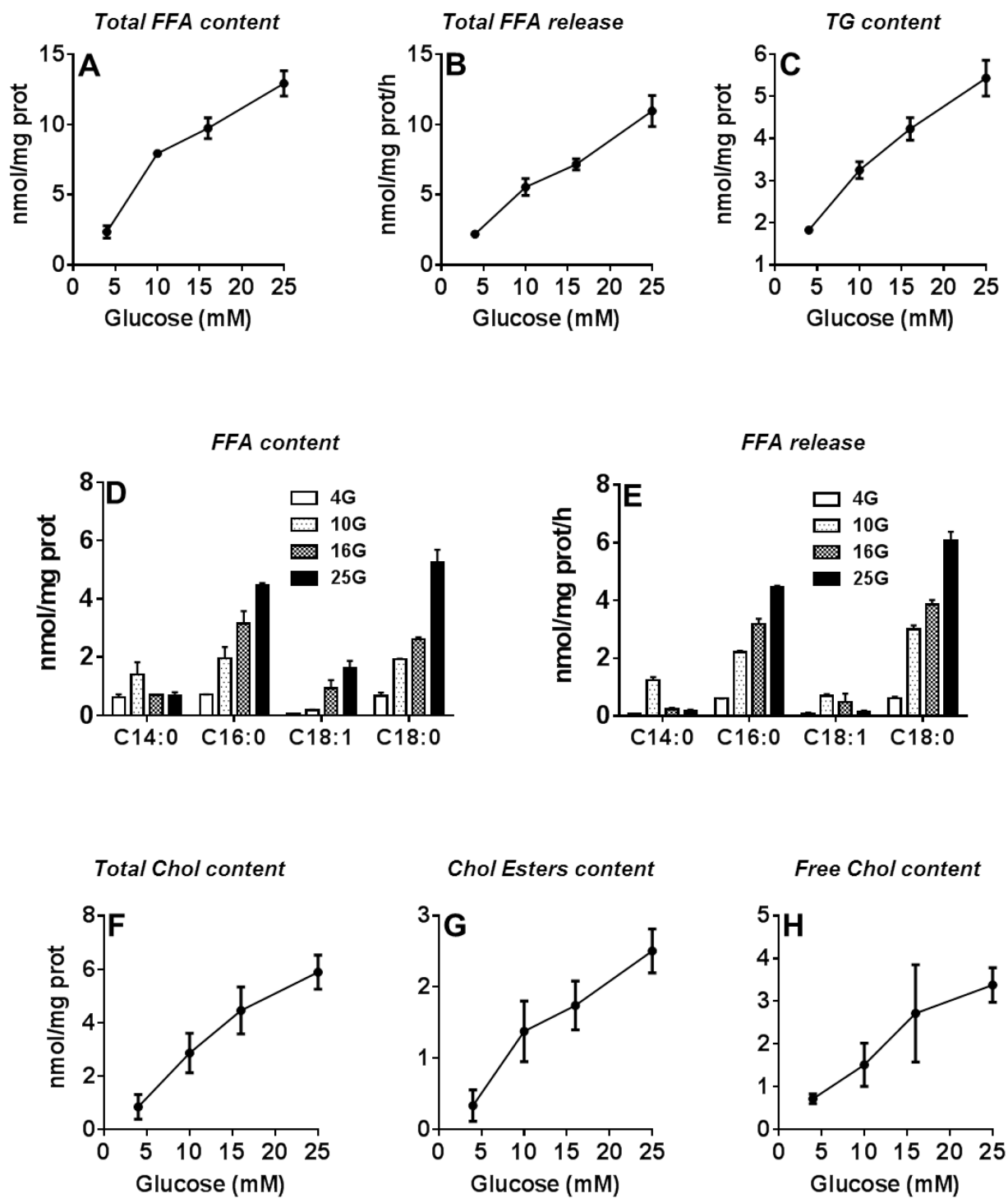
FIGURE 2

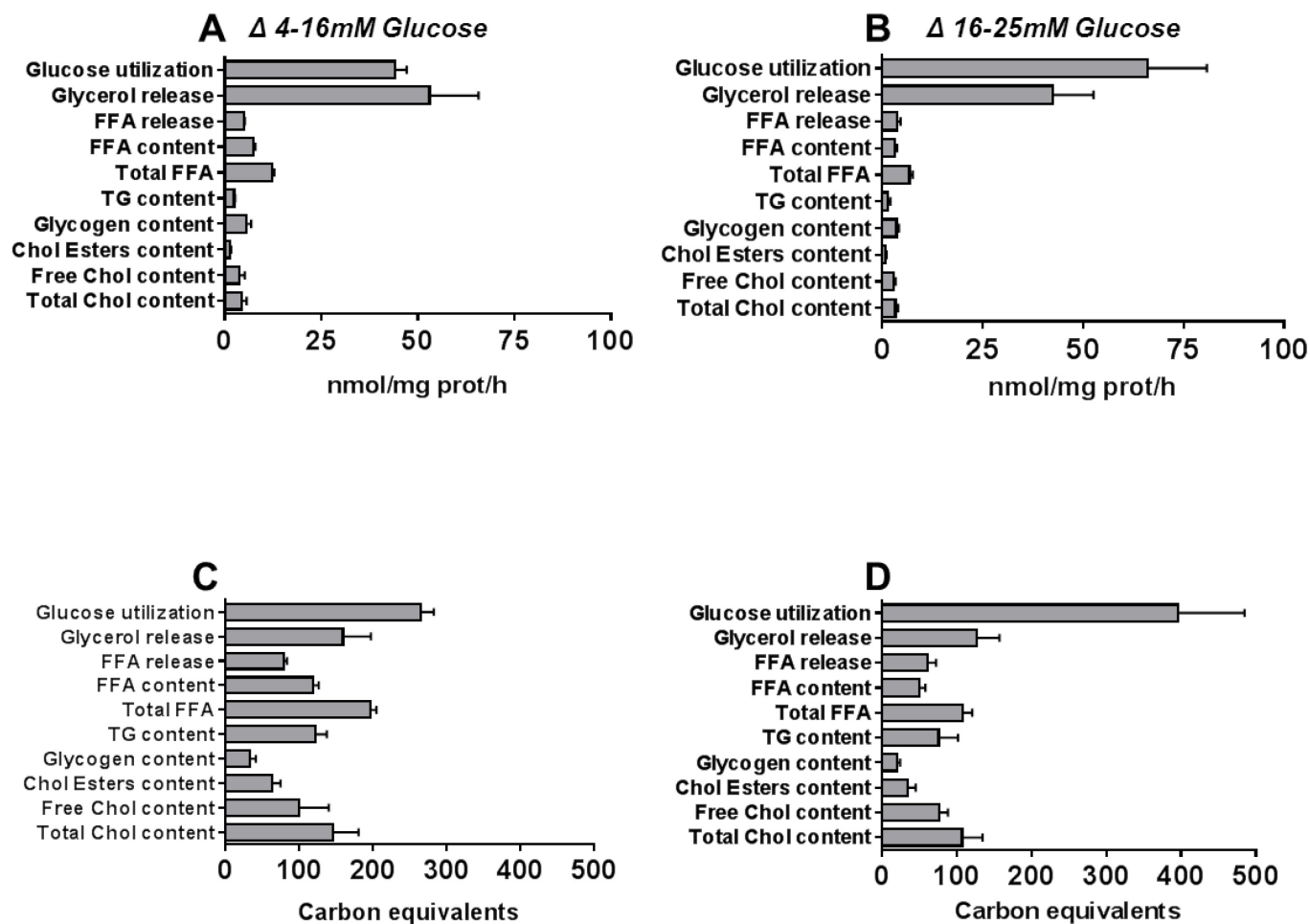
FIGURE 3

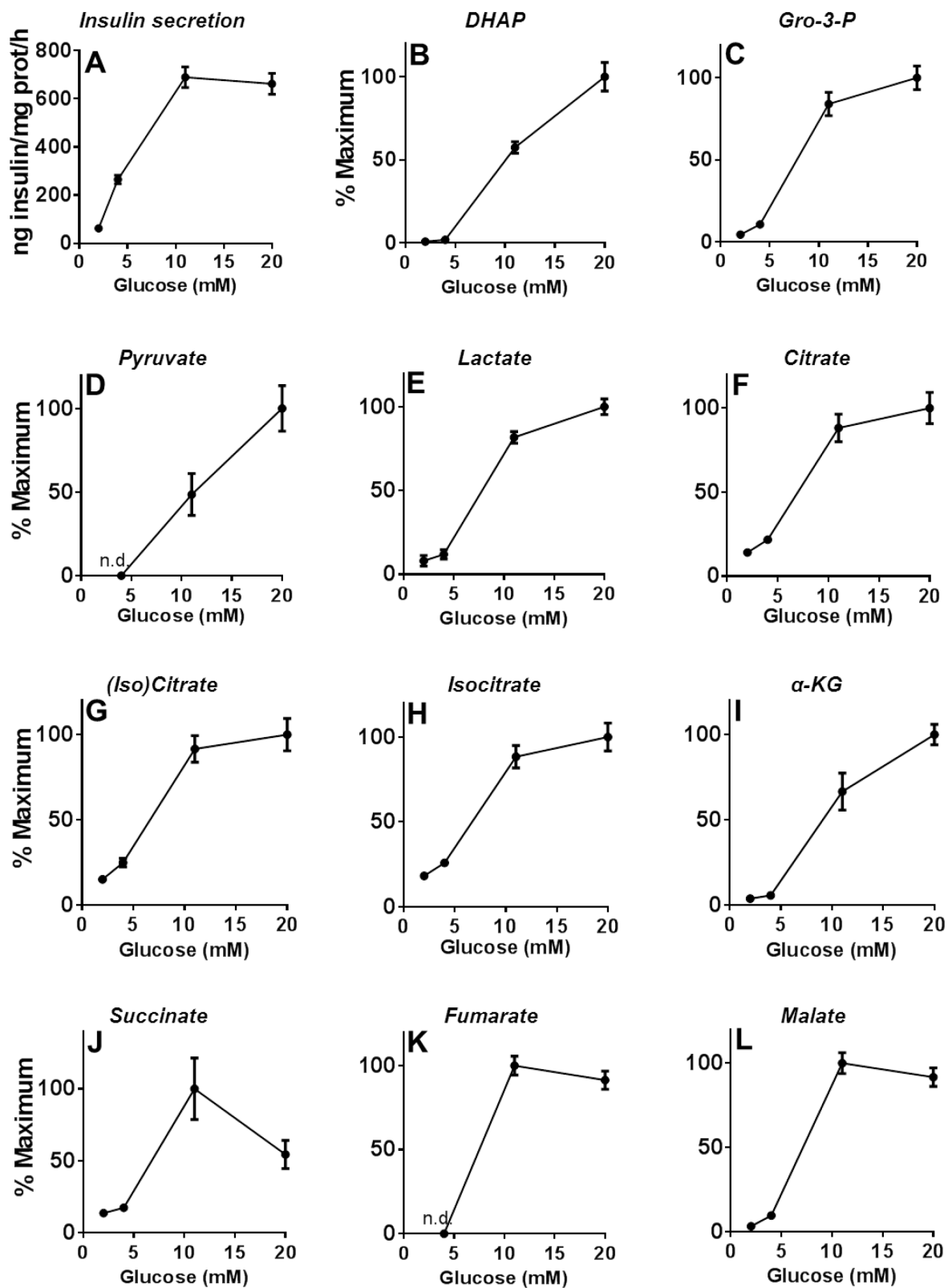
FIGURE 4

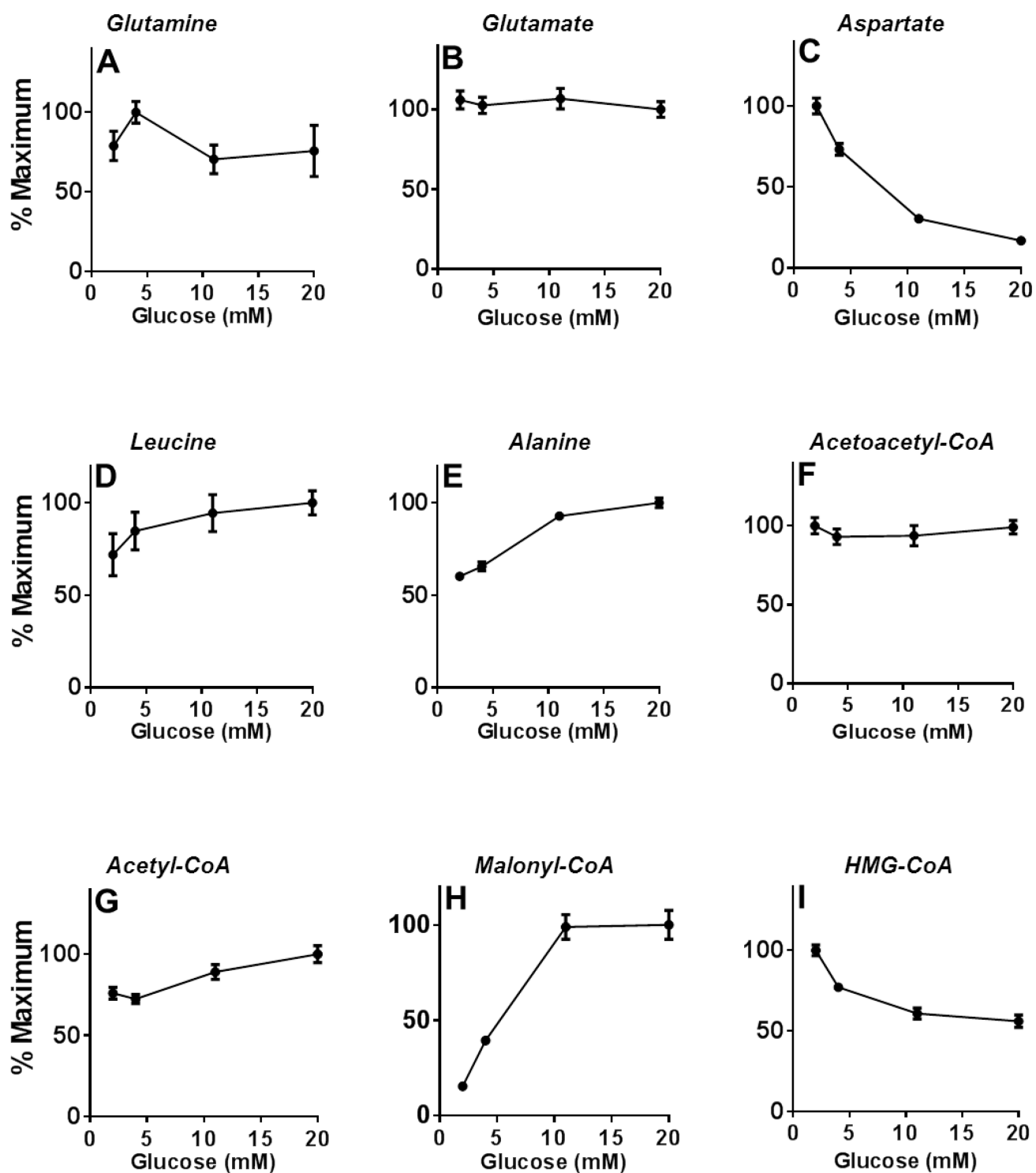
FIGURE 5

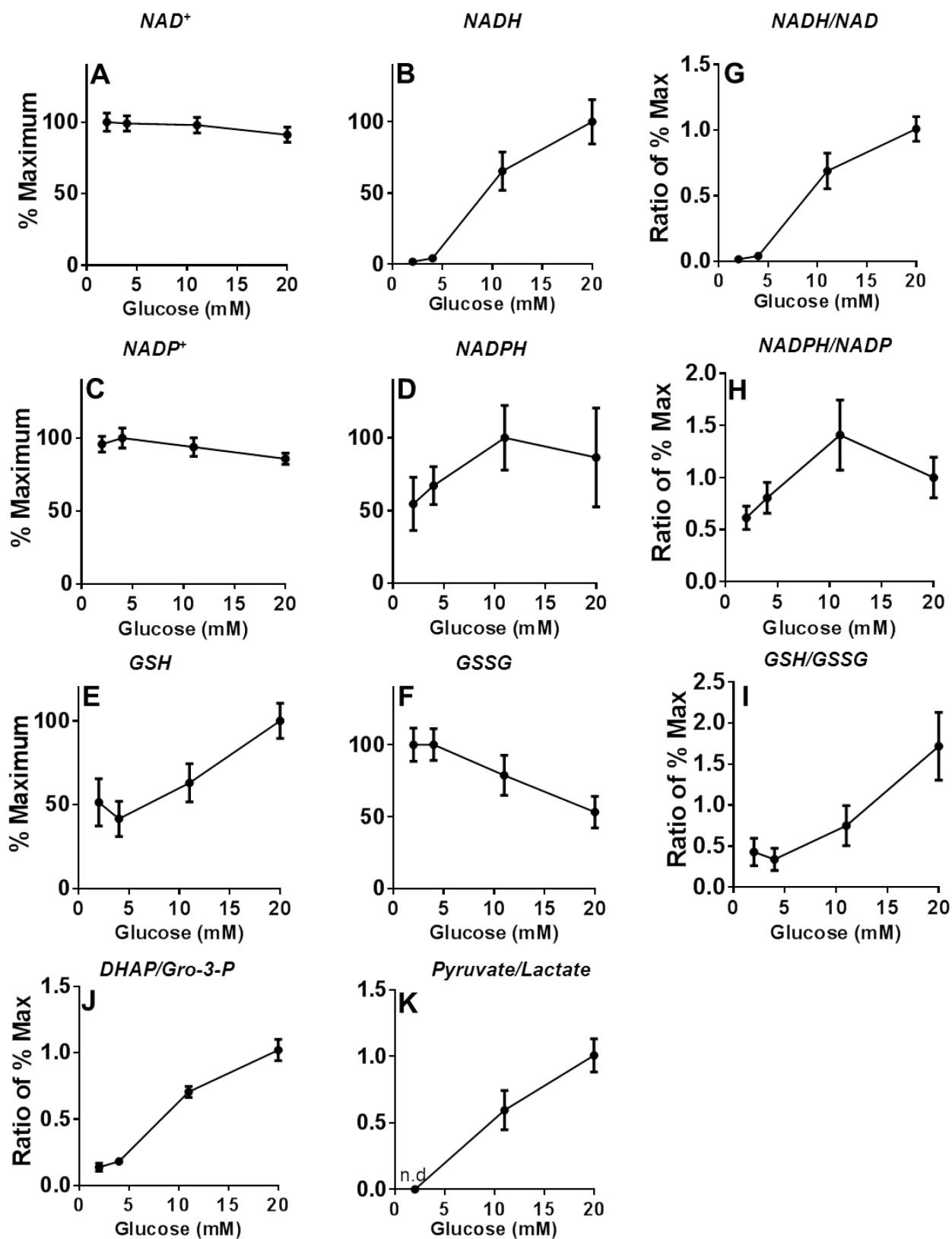
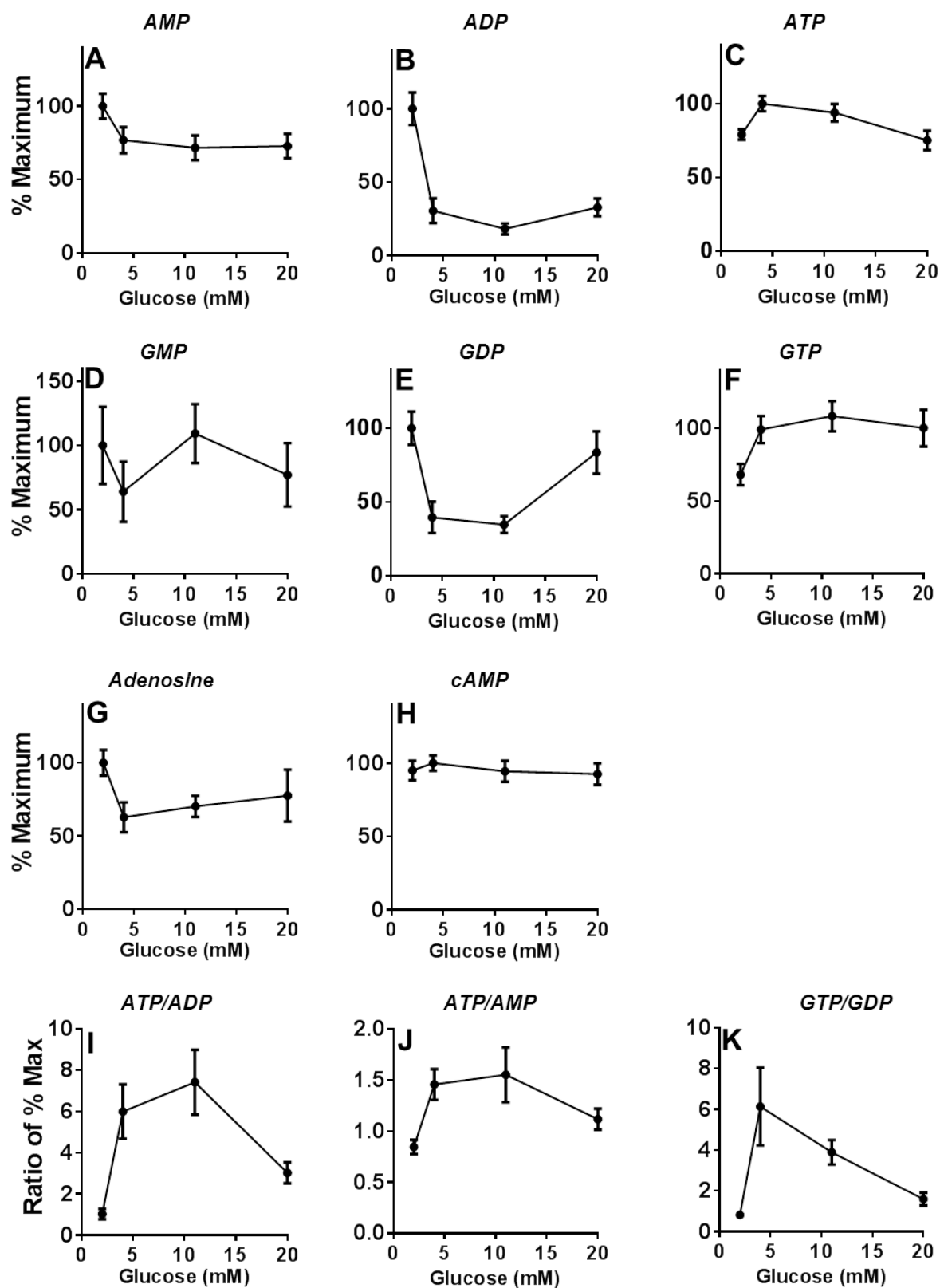
FIGURE 6

FIGURE 7

2.2 ARTICLE 2

Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: Role in metabolism and signaling in pancreatic β -cells and hepatocytes

Yves Mugabo^{a,1}, Shangang Zhao^{a,1}, Annegrit Seifried^b, Sari Gezzar^a, Anfal Al-Mass^c, Dongwei Zhang^d, Julien Lamontagne^a, Camille Attane^a, Pegah Poursharifi^a, José A. Iglesias^e, Erik Joly^a, Marie-Line Peyot^a, Antje Gohla^b, S.R. Murthy Madiraju^{a,2}, and Marc Prentki^{a,2}

^aDepartments of Nutrition and Biochemistry and Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM and Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

^bInstitute for Pharmacology and Toxicology and Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany

^cMontreal Diabetes Research Center, CRCHUM and Department of experimental medicine, McGill University, Montréal, QC, Canada

^dCurrent address: Diabetes Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, China

^eCurrent address: Departamento de Nutricion y Bioquímica, Pontificia Universidad Javeriana, Cra 7, No. 43-82, Edif. Carlos Ortiz., Bogotá, Colombia

¹ Co-first authors

² Corresponding author

*Correspondence to:

Dr. Marc Prentki, Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, 900 St-Denis (Viger Tower), Rm R08-412, Montreal, QC H1W 4A4, Canada. Phone: 1-514-890-8000 # 23642. Fax: 1-514-412-7648. marc.prentki@umontreal.ca

Dr. S.R. Murthy Madiraju, Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, 900 St-Denis (Viger Tower), Rm R08-414, Montreal, QC H1W 4A4, Canada. Phone: 1-514-890-8000 # 23610. Fax: 1-514-412-7648. murthy.madiraju@crchum.qc.ca

Keywords: glycerol-3-phosphate phosphatase; gluconeogenesis; glucolipotoxicity; type 2 diabetes; glucose stimulated insulin secretion; lipolysis; glycerolipid/fatty acid cycle

Short title: A mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase

Published in: PNAS 2016

ABSTRACT

Obesity and associated disturbed glycerolipid/ fatty acid (GL/FA) cycle, contribute to insulin resistance, islet β -cell failure and to type 2 diabetes. Flux through the GL/FA cycle is regulated by the availability of glycerol-3-phosphate (Gro3P) and fatty acyl-CoA. We describe here a mammalian Gro3P phosphatase (G3PP), which was not known to exist in mammalian cells, that can directly hydrolyze Gro3P to glycerol. We identified that mammalian phosphoglycolate phosphatase with an uncertain function, acts in fact as a G3PP. We found that G3PP, by controlling Gro3P levels, regulates, glycolysis and glucose oxidation, cellular redox and ATP production, gluconeogenesis, glycerolipid synthesis and fatty acid oxidation in pancreatic islet β -cells and hepatocytes and glucose stimulated insulin secretion and the response to metabolic stress e.g., glucolipotoxicity in β -cells. *In vivo* overexpression of G3PP in rat liver lowers body weight gain and hepatic glucose production from glycerol and elevates plasma HDL. G3PP is expressed at various levels in different tissues and its expression varies according to the nutritional state in some tissues. Since Gro3P lies at the crossroads of glucose, lipid and energy metabolism, control of its availability by G3PP adds a key level of metabolic regulation in mammalian cells, and G3PP offers a potential target for type 2 diabetes and cardiometabolic disorders.

Significance Statement

Glycerol-3-phosphate (Gro3P) lies at the crossroads of glucose, lipid and energy metabolism in mammalian cells and is thought to participate either in glycolysis, or gluconeogenesis, lipid synthesis and Gro3P electron transfer shuttle to mitochondria. We now report a novel pathway of Gro3P metabolism in mammalian cells with the identification of Gro3P phosphatase (G3PP) that can directly hydrolyze Gro3P to glycerol. We observed that G3PP expression level controls glycolysis, lipogenesis, lipolysis, fatty acid oxidation, cellular redox and mitochondrial energy metabolism in β -cells and hepatocytes, as well as glucose induced insulin secretion and the response to metabolic stress in β -cell, and gluconeogenesis in hepatocytes. G3PP is a novel player in metabolic regulation and signaling and offers a potential target for cardiometabolic disorders.

The glycerolipid/ fatty acid (GL/FA) cycle, which is central to energy homeostasis, balances glucose and lipid metabolism (1, 2) and generates metabolic signals (3, 4). This cycle is deregulated in obesity and T2D. Under conditions of fuel surfeit with excessive glucose and free fatty acid (Sluse et al.) supply, a substantial portion of glucose is utilized in mammalian cells via formation of glycerol-3-phosphate (Gro3P) and its incorporation into GL via GL/FA cycle (4, 5). The cycle consists of lipogenesis and lipolysis segments and generates intermediates for the synthesis of various types of complex lipids but also signals that control many biological processes, including insulin secretion and action (3, 6, 7). The proper operation of this cycle possibly protects β -cells and other cell types from glucolipotoxicity and metabolic stress (4, 8, 9).

Lipogenesis, i.e., the successive esterification of glycolysis-derived Gro3P with fatty acyl-CoA (FA-CoA), produces triglyceride (TG), which can be stored as lipid droplets (10). Lipolysis of TG is initiated by adipose triglyceride lipase, to generate diacylglycerol (DAG), which is hydrolyzed by hormone sensitive lipase to give rise to monoacylglycerol (MAG). MAG hydrolysis either by classical MAG lipase or by α/β -Hydrolase domain-6 (ABHD6) to glycerol and FFA completes the lipolytic segment of the GL/FA cycle (2, 3).

Presently glycerol release from mammalian cells is thought to occur exclusively from the lipolytic segment of the GL/FA cycle and glycerol production is considered to reflect lipolysis flux. We earlier proposed that at high glucose concentrations the release of glycerol by β -cells, which do not express glycerokinase that transforms glycerol to Gro3P (Consortium et al.), is a mechanism of "glucolipodetoxification" and that this process is dependent on the lipolysis segment of GL/FA cycle (3, 4). Indeed, mammalian cells are not known to harbor a Gro3P phosphatase (G3PP) (11), which could directly generate glycerol from Gro3P. In an earlier study on mass isotopomer distribution analysis of glucose labeling from [^{13}C]glycerol in liver, glycerol-3-phosphate hydrolysis activity was speculated but was not directly demonstrated (12). Thus, the fate of Gro3P in mammalian cells is thought to be its conversion to either dihydroxyacetone phosphate (DHAP) or lysophosphatidate, the first intermediate of the lipogenic arm of the cycle. However, many microbes (13-15) and plants (16) harbor a G3PP. We now describe that a previously known phosphoglycolate phosphatase (PGP) (17) with an uncertain function in mammalian cells acts as a specific G3PP and plays a pivotal role in the

regulation of glucose and lipid metabolism and signaling as well as in the response to metabolic stress.

RESULTS AND DISCUSSION

Dichotomy in orlistat effect on glycerol and FFA release in β -cells

The discovery of a mammalian G3PP started from the fortuitous observation of a dichotomy of inhibitory effects of the panlipase and lipolysis inhibitor orlistat on glycerol and FFA release at various glucose concentrations from β -cells. Thus, orlistat inhibited lipolysis at high glucose concentrations in INS832/13 β -cells and in rat islets as evidenced by the reduction in FFA release; however, the increased release of glycerol in the presence of elevated glucose concentration was not inhibited (Fig. 1 *A* and *B* and Fig. S1 *A* and *B*), indicating that not all glucose-derived glycerol arises from lipolysis. In rat islets at medium concentration of glucose (10 mM), orlistat showed moderate inhibition of glycerol release indicating that at this glucose concentration, a small amount of glycerol does arise from lipolysis. Thus in β -cells there must exist an alternate mechanism for producing glycerol, besides lipolysis. The direct hydrolysis of glucose-derived Gro3P by a hypothetical Gro3P phosphatase is a plausible source of glycerol.

Structural similarity between phosphoglycolate phosphatase and bacterial G3PP

A Blast analysis of various known G3PP against mammalian sequences led to the identification of PGP (17), whose function in mammalian cell is uncertain and which belongs to the class of haloacid dehalogenase (HAD) type hydrolases. Recently PGP was suggested to possess protein tyrosine phosphatase activity and was called ‘aspartate-based, ubiquitous, Mg^{2+} -dependent phosphatase’ (AUM) (18). Although the catalytic efficiency of AUM/PGP towards the generic protein tyrosine phosphatase substrate *p*-nitrophenolphosphate (*p*-NPP) was ~1000-fold higher than the activity of the well-established HAD-type protein tyrosine phosphatase Eya3, its activity was ~1000 fold less than that of classical tyrosine phosphatases like PTP1B, TCPTP, or SHP1, raising the possibility that PGP/AUM may also dephosphorylate other low molecular weight substrates/metabolites, in addition to those reported previously (18). An amino acid sequence comparison and structural overlay showed high similarity of the murine PGP/AUM cap with the cap domain of the recently described mycobacterial G3PP, Rv1692 (13) in residue orientation

and composition and suggested that PGP is indeed a bonafide G3PP (Fig. 1 C and D and Fig. S1C). PGP belongs to the subtype of cap-domain containing HAD-phosphatases. This domain features a specificity loop with evolutionarily highly conserved residues that are required for proper substrate coordination in the active site of the hydrolase (19, 20). The sequence alignment of Rv1692 and mPGP revealed conservation of a number of those amino acid residues that were recently identified to be important for proper substrate positioning in murine PGP/AUM (18). There is near perfect alignment of the cap domains of PGP and Rv1692 and of the critical leucine residue at position 204 in mPGP (18) and 155 in Rv1692, as revealed by structural overlay (Fig. 1D). A zoom in the substrate binding pocket shows that the critical and evolutionarily conserved cap domain residues involved in substrate coordination are identical between PGP and the mycobacterial G3PP, Rv1692 (Fig. S1C).

Phosphoglycolate phosphatase acts as a specific G3PP

Purified recombinant murine PGP expressed as described before (18) showed high activity with glycerol-3-phosphate, with a K_m of 1.29 mM and k_{cat} of 0.1 s^{-1} (Fig. 1E). At saturating substrate concentration, mPGP showed specific activity of $\sim 100 \text{ nmol/min/mg protein}$ with Gro3P, while its activity towards other related substrates such as dihydroxyacetone phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate, 3-phosphoglycerate, creatine phosphate, glucose-6-phosphate and ribose-5-phosphate was much lower (Fig. 1F). Activity with inositol 3,4,5 trisphosphate and lysophosphatidic acid was seen only with very high non-physiological concentrations of these compounds. The overexpressed human PGP in 293T cell extracts showed similar K_m ($\sim 1.4 \text{ mM}$) for Gro3P as the purified murine PGP and a V_{max} of $\sim 150 \text{ nmol/min/mg protein}$ (Fig. 1G). Human PGP in whole cell extracts showed similar affinity for 2-phosphoglycolate ($\sim 1.5 \text{ mM}$) but higher V_{max} ($\sim 500 \text{ nmol/min/mg protein}$), indicating that this enzyme has higher capacity to hydrolyze 2-phosphoglycolate (Fig. 1G). Under the same incubation conditions, activity with glucose-6-phosphate was negligible (Fig. 1G). In INS832/13 rat β cells, there was significant amount of native PGP/G3PP enzyme in terms of V_{max} , which was $47 \text{ nmol/min/mg protein}$ (Fig. 1H). High glucose concentration stimulated glycerol release in INS832/13 β -cells was reduced by RNAi-knockdown of native PGP (Fig. 1 I and J and Fig. S1D), greatly elevated by overexpression of human PGP (Fig. 1 K and L), and the decrease caused by RNAi-knockdown

was reversed by overexpression of hPGP in the same cells (Fig. S1E). Overall the data demonstrate that PGP acts as a G3PP *in vitro* and in intact cells.

G3PP activity controls insulin secretion and glucolipotoxicity in pancreatic β -cells

Since Gro3P is one of the starting substrates for the GL/FA cycle that produces lipid signals for glucose stimulated insulin secretion (GSIS), alteration of Gro3P levels by G3PP should influence insulin secretion (21). All the three different G3PP-siRNAs reduced G3PP expression effectively (Fig. S1D) and we selected G3PP-siRNA-1 and control siRNA-1 for rest of the study. In accordance with this prediction, RNAi-knockdown of native rat G3PP in INS832/13 β -cells elevated GSIS (Fig. 2A) while overexpression of hG3PP reduced GSIS (Fig. 2B), without affecting basal secretion. Similar results were obtained in isolated rat islets infected with lentiviral shRNA-G3PP for RNAi-knockdown or adenoviral hG3PP for overexpression (Fig. 2 C and D). The role of G3PP activity in regulating GSIS was confirmed by the observation that overexpression of hG3PP in INS832/13 cells curtailed the increased GSIS caused by RNAi-knockdown of endogenous G3PP (Fig. S1F).

Chronic elevated glucose exposure of β -cells without or with high concentrations of exogenous FFA cause glucotoxicity and glucolipotoxicity, respectively, as indicated by caspase-3 activity, an index of apoptosis (22). The mechanism involves enhanced glucose metabolism and esterification of FFA (23) resulting in mitochondrial dysfunction, ROS production and ER stress. Reducing G3PP expression in INS832/13 β -cells, which is likely to elevate the formation of glycerolipid intermediates, caused enhanced glucotoxicity (Fig. 2E), while overexpression of hG3PP led to decreased glucotoxicity (Fig. 2F). Glucolipotoxicity, which was enhanced by G3PP knockdown, was curtailed by hG3PP overexpression that also reversed the toxic effect of G3PP knockdown under glucolipotoxic condition (Fig. 2G). Thus, changes in G3PP activity in the β -cell modulate insulin secretion and the response to metabolic stress.

Tissue distribution and nutritional regulation of G3PP

Expression of G3PP both at the mRNA (Fig. S2 A, C and E) and protein (Fig. S2 B, D and F) levels is apparently ubiquitous since it was detected in all tissues examined; it was found particularly high in testis followed by heart, skeletal muscle and islet tissue. Liver, kidney,

intestine and visceral white adipose tissue showed low expression, probably because these tissues are engaged in either gluconeogenesis and/or lipogenesis, both of which require Gro3P supply. The high expression of G3PP in heart and skeletal muscle possibly ensures no toxic accumulation of lipids in these fat burning tissues (24). The role of this enzyme in testis is not clear.

G3PP expression is regulated by nutritional status. Thus G3PP mRNA and protein is inversely changed in white adipose vs brown adipose under fed and fasted state (Fig. S2 *A* and *B*) and under high fat diet (HFD) vs normal diet conditions (Fig. S2 *C* and *D*). These changes may reflect the adaptation for regulation of nutrient metabolism in adipose tissues. Thus, elevated G3PP in white adipose in fasted state ensures supply of glycerol into circulation rather than glycerol re-incorporation into glycerolipids (25), for the purposes of gluconeogenesis in liver and kidney, whereas the decreased G3PP expression in brown adipose ensures trapping of incoming FFA and glucose into glycerolipids, for future usage, as well as for fuel usage for thermogenesis during fasting. Conversely, the decreased expression of G3PP in white adipose tissue in HFD condition should help in the storage of fat while in brown adipose, such storage is not needed and the elevated G3PP levels ensure effective burning of fatty acids in BAT mitochondria. Hence, nutritional control of G3PP exemplifies the importance of this enzyme in fuel and energy metabolism as its expression is differentially regulated in different tissues.

G3PP expression level influences glucose, lipid and energy metabolism in β -cells

Because Gro3P is a central metabolic intermediate that lies at the crossroads of glucose and lipid metabolism, we examined whether G3PP also plays a critical role in metabolic regulation (Fig. 2*H*). As expected, RNAi knockdown of G3PP in INS832/13 cells increased the synthesis of 1,2(2,3)-DAG, 1,3-DAG, TG, total phospholipids, lysophosphatidylinositol, lysophosphatidate and lysophosphatidylcholine (Fig. 3*A* and Fig. S3*A*), whereas overexpression led to their decreased synthesis (Fig. 3*B* and Fig. S3*B*). Considering that many of these lipids have signaling roles in different cells (3), G3PP is likely to regulate these signaling pathways. In INS832/13 cells, altered activity of G3PP had no effect on fatty acid oxidation either at low or high glucose concentration (Fig. 3*C*). FFA release from these cells, which is mostly dependent on lipolysis, was elevated when G3PP was overexpressed, indicating that a reduction in Gro3P levels following G3PP overexpression, lowers the reesterification of FFA, leading to their elevated

release from the cells (Fig. 3D). In rat islets, glucose-stimulated glycerol release was lowered by G3PP knockdown and increased by G3PP overexpression (Fig. 3E), similar to that noticed with INS832/13 cells (Fig. 1 J and L).

Since Gro3P directly transfers electrons to mitochondria via the action of mitochondrial Gro3P dehydrogenase, changes in Gro3P levels during glucose oxidation, are expected to influence respiration. Thus, in rat islets reducing G3PP expression led to elevated O₂ consumption and ATP production (Fig. 3F), while hG3PP overexpression caused opposite changes (Fig. 3G), without affecting H⁺ leak in both cases. Similar results were obtained using INS832/13 cells (Fig. S3 C and D). Altered G3PP protein levels were confirmed in rat islets after shRNA knockdown and hG3PP overexpression (Fig. 3 H and I). The increased ATP levels in β -cells by G3PP knockdown relate to the increased GSIS seen under these conditions (21). Thus altered expression of G3PP in β -cells has a significant impact on glucose, lipid and mitochondrial metabolism and consequently on the response of these cells for metabolic signal transduction and GSIS.

G3PP controls glycolysis, gluconeogenesis and lipid metabolism in hepatocytes

Liver is the major site of gluconeogenesis starting either from amino acids or adipose lipolysis derived glycerol and both pathways involve the formation of Gro3P (Fig. 2H). Thus, in primary rat hepatocytes, shRNA-knockdown of G3PP (Fig. S4A) led to a great increase in gluconeogenesis both from glycerol and from pyruvate + lactate (Fig. 4A), whereas overexpression of hG3PP in these cells (Fig. S4B) completely curtailed gluconeogenesis (Fig. 4F).

Fatty acid oxidation in liver is dependent on the availability of fatty acyl-CoA substrate, which is controlled by the extent of esterification by glycerol-phosphate acyltransferase-1 (26). Fatty acid oxidation was directly related to G3PP expression levels in rat hepatocytes, and at high glucose, which suppress β -oxidation, elevated G3PP expression caused enhanced fatty acid oxidation (Fig. 4 B and G). This is different from the results with INS832/13 cells and probably reflect the highly lipogenic nature of liver tissue as compared to β -cells. Thus, FFA entering cells must be esterified before being oxidized following lipolysis of endogenous lipid stores (27). In hepatocytes also, glycerol release at high glucose was reduced by G3PP knockdown and elevated by its overexpression (Fig. 4 C and H).

Knockdown of G3PP in hepatocytes enhanced lactate production and release, an index of glycolytic flux, as expected, because of decreased diversion of glucose carbons in the form of glycerol via G3PP (Fig. 4 *D* and *E*). Conversely, overexpression of hG3PP had reverse effects, reducing glycolytic flux (Fig. 4 *I* and *J*). The overall increase in glycolytic flux compared to non-infected cells is due to viral infection, which is known to accelerate glycolysis (28, 29). Similar to the changes in INS832/13 cells, lipogenesis was affected by altered G3PP expression in rat hepatocytes (Fig. 4 *K* and *L* and Fig. S4 *C* and *D*). Formation of cholesterol esters was markedly decreased by the overexpression of G3PP in liver cells (Fig. S4*D*), and this may be due to reduced availability of fatty acyl groups due to their enhanced flux through mitochondrial β -oxidation.

Regulation of cellular redox and energy production by G3PP

Metabolite measurements using LCMSMS in rat hepatocytes revealed a significant decrease in both Gro3P and DHAP following hG3PP overexpression, whereas G3PP knockdown led to a marked increase in Gro3P at 25 mM glucose (Fig. 5 *A* and *B*). We calculated the intracellular metabolite concentrations assuming average intracellular water volume to be 2.54 μ l/mg protein (30). Intracellular Gro3P concentrations in control hepatocytes were 2 and 4.5 mM at 5 and 25 mM glucose, respectively, and the corresponding DHAP concentrations were 0.03 and 0.095 mM, respectively. Thus the intracellular Gro3P concentration is sufficient enough for the G3PP to use this substrate effectively since it is in the range of its K_M value. The ratio of Gro3P/DHAP increased greatly only when G3PP was knocked down at 25 mM glucose (Fig. 5*C*). Lactate levels decreased and pyruvate levels increased after G3PP overexpression and the opposite changes were noted after G3PP knockdown (Fig. 5 *D* and *E*). This is in line with the enzymatic measurements of lactate (Fig. 4 *D*, *E* and *I*, *J*). Interestingly, the ratio of lactate to pyruvate, which reflects the cytosolic redox, was decreased by G3PP overexpression and increased by G3PP knockdown (Fig. 5*F*), indicating that G3PP regulates cellular redox. Thus, G3PP levels were reciprocally related to cellular total NADH levels (Fig. 5*G*). We also noticed a significant decline in total NAD^+ levels by G3PP overexpression (Fig. 5*H*), which may be related to lowered production of ATP (Fig. 5*K*), which is needed for the synthesis of NAD^+ . Such reduced formation of ATP during respiration was also observed in rat islets (Fig. 3*G*). Changes in cellular redox ratio (NADH/NAD^+) were more evident upon G3PP knockdown than after G3PP

overexpression (Fig. 5I), probably because of reduced total NAD^+ levels. These results suggest that G3PP, by promoting Gro3P to glycerol conversion, actually regulates NADH/NAD^+ ratio in the cell and thus ATP production. Thus, overexpression of G3PP causes a shift in glucose carbon flux towards glycerol formation leading to a decrease in DHAP and also in NADH (used for DHAP to Gro3P conversion) (see Fig. 2H), which results in reduced ATP formation and also reduced lactate production, an index of glycolysis, in hepatocytes. The reverse is true when G3PP is knocked-down, leading to elevated ATP production. Thus G3PP appears to directly regulate cellular redox and energy production.

Gro3P but not 2-phosphoglycolate is the physiologically relevant substrate for G3PP/ PGP

Significantly, 2-phosphoglycolate (2-PG) levels were found to be very low (<0.04 nmol/mg protein or <0.02 mM), about 250-fold lower than Gro3P levels and also ~ 75 -fold lower than the K_m for PGP/G3PP, in hepatocytes and cellular content of G3PP/ PGP had no major effect on 2-PG levels (Fig. 5J). However, Gro3P cellular concentration calculated from our results on hepatocytes ranges from 2 to 4.5 mM at low and high glucose concentration. Similarly, in INS832/13 cells Gro3P concentration was calculated to be ~ 1.5 mM at 10 mM glucose concentration (31). These cellular concentrations of Gro3P are quite favorable for G3PP/PGP to use this substrate effectively. Thus our results indicated that 2-PG is not a physiologically relevant substrate for this enzyme, at least in hepatocytes, even though this enzyme can efficiently hydrolyze 2-PG, when available at very high concentrations in a cell extract. It is important to keep in mind that 2-PG is formed in cells during repair of DNA strands, when they are broken, for example, in the presence of chemical agents like bleomycin or radiation (32) and its levels in normal tissues and cells are quite low. It has been reported earlier that 2-PG levels in liver tissue to be about 19 to 20 μM (33) and that in many other tissues including blood this metabolite is present in micromolar concentrations only. Therefore, the normal physiological function of this enzyme is very likely to be in the control of Gro3P levels via its hydrolysis.

***In vivo* overexpression of G3PP reduces hepatic glucose production and plasma triglycerides in rats**

In order to further understand the metabolic regulatory role of G3PP, we injected adenoviral vector coding for hG3PP or GFP (control) to rats. One week post injection, expression of G3PP in liver was greatly elevated (Fig. 6 A and B) while it was not altered in other tissues (Fig. S4 G).

One day post injection Adv-hG3PP injected rats showed ~10% reduction in body weight, which was maintained for the next 6 days as compared to Adv-GFP injected rats (Fig. 6 C and D). Adv-G3PP rats also showed a modest reduction in cumulative food intake (Fig. 6 E). After one week, plasma glycerol levels were markedly elevated (Fig. 6 F), indicating that the overexpressed G3PP in liver is able to generate glycerol *in vivo*, which is released into blood. In agreement with the observation in isolated hepatocytes and INS832/13 cells, *in vivo* liver overexpression of G3PP led to reduced plasma TG levels (Fig. 6 G), which is likely due to reduced hepatic TG synthesis. Circulating low-density and high-density lipoproteins (LDL and HDL) were modestly affected, with HDL showing a significant increase (Fig. S4 E and F) while LDL showing a decreasing trend. Hepatic glucose production from glycerol during a glycerol load test was reduced in Adv-G3PP injected rats (Fig. 6 H), showing that liver gluconeogenesis from glycerol was affected, as was the case with isolated rat hepatocytes.

Conclusion

The possibility of Gro3P hydrolysis in mammalian cells (34) and fish (11, 35) was previously considered but no clear evidence could be obtained. In a recent work, it has been suggested that in liver there is a NADH/NAD⁺ ratio dependent direct formation of glycerol from Gro3P, generated by high carbohydrate intake, particularly under conditions of mitochondrial aspartate-glutamate carrier isoform-2 (citrin) deficiency; however no enzyme for this conversion was suggested (36).

Recently, it has been proposed that the action of the antidiabetic agent metformin entails at least in part mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) inhibition resulting in increased hepatic cytosolic redox that lowers hepatic gluconeogenesis (37) (Fig. 2H). In the present work, the net anticipated result of enhanced G3PP activity and reduced Gro3P levels is also decreased flux through mitochondrial G3PDH because there is less substrate for this enzyme. However, G3PP activation will result in decreased cytosolic NADH rather than increased as metformin does. Thus, because of the irreversible nature of G3PP reaction, its over-activity pulls glycolytic carbon flux towards glycerol formation. As a result cytosolic NADH, which is formed during glycolysis, is consumed to reduce dihydroxyacetone-phosphate to Gro3P, by cytosolic Gro3P dehydrogenase. Hence, both metformin and elevated G3PP activity

inhibit gluconeogenesis but via different mechanisms: metformin by increasing the cytosolic redox and G3PP by removing Gro3P and dihydroxyacetone-phosphate, the substrates of gluconeogenesis (Fig. 2H).

In sum, we have identified a metabolic enzyme in mammalian cells that can directly transform Gro3P to glycerol. The identification of a previously unrecognized G3PP in mammalian cells is an important addition to our understanding of metabolic regulation and signaling at large. We have shown that G3PP expression level controls several metabolic pathways and biological processes (Fig. 2H) in a tumoral β -cell line and in normal rat islets as well as in hepatocytes. These include, depending on the cell type, glycolysis, gluconeogenesis, lipogenesis, phospholipid synthesis, lipolysis, fatty acid oxidation and mitochondrial energy metabolism, cellular redox and ATP production. In addition G3PP regulates glucose induced insulin secretion and the response to metabolic stress in the β -cell. Thus G3PP is an attractive target for metabolic syndrome related disorders. It is anticipated that enhanced activity of G3PP to be beneficial under conditions of type-2 diabetes and obesity, as it protects β -cells from fuel surfeit toxicity and from exhaustion due to over-stimulation by high glucose concentrations and reduces hepatic glucose production and the lipogenic burden.

MATERIALS AND METHODS

Animals. All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals. Five-week-old male C57BL/6N mice and Wistar rats (85-250g) were housed on a 12-h light/dark cycle with free access to water and standard diet (15% fat by energy). Mice were fed with either chow or high fat diet (HFD; 60% calories from fat) for 8 weeks. G3PP expression was evaluated in chow fed, HFD fed and overnight fasted mice.

Islet and hepatocyte isolation. Pancreatic islets were isolated from rats and mice (38). Isolated islets were cultured overnight at 37°C in complete RPMI 1640 medium. Hepatocytes were isolated from rats by *in situ* collagenase perfusion and were seeded in DMEM complete medium.

Insulin secretion. Insulin secretion in INS832/13 cells (39) and isolated islets was measured in static incubations (38). Details are given in Supplementary Experimental Procedures.

Over-expression and RNAi knockdown of G3PP. pCMV-based plasmids expressing human G3PP and Green Fluorescent Protein (GFP) were used. After transfection using lipofectamine INS832/13 cells were cultured for 48h in 96-well, 12-well or 6-well plates. siRNAs against G3PP and two scrambled-siRNA were introduced into INS832/13 cells by RNAiMAX (40). Transfected cells were used for Western blotting and measurements of insulin secretion, caspase activity, glycerol and FFA release, O₂ consumption and fatty acid oxidation and esterification.

Quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted from INS 832/13 cells, islets and rodent tissues and first strand cDNA was synthesized from 2µg of total RNA. RT-qPCR was performed and the products were quantified using the FastStart DNA Master PLUS SYBR green kit (Roche Diagnostics). Expression levels were normalized for the 18S or cyclophilin mRNA transcript.

Free fatty acids and glycerol release. For FFA determinations, rat islets were pre-incubated for 1h in KRBH containing 2 mM glutamine and 4 mM glucose and then for 2h at 4, 10, 16 and 25 mM glucose. The low and high glucose concentrations were 2 and 10 mM, for INS832/13 cells with 2 mM glutamine present. Incubations were done without and with the panlipase inhibitor, orlistat. FFA released into the medium were extracted by a modified Dole-Meinertz procedure and quantified by reverse phase HPLC (40). Glycerol release was determined by a radiometric glycerol assay using [γ -³²P]ATP and glycerokinase.

Plasma chemistry. Triglycerides and glycerol were measured using a colorimetric assay kit

(Sigma) and low density lipoprotein and high density lipoproteins using a kit (Wako, L-Type LDL-C).

Fatty acid esterification and oxidation. Fatty acid esterification and oxidation in the transfected INS832/13 cells and infected hepatocytes were measured at low and high glucose as indicated in figure legends.

Glucotoxicity and glucolipotoxicity. The effect of either overexpression or knockdown of G3PP in INS832/13 cells on caspase-3 activity was assessed at 5 or 20 mM glucose with or without 0.3 mM palmitate.

Oxygen consumption and mitochondrial function. Respiration measurements *in vitro* were made in a XF24 respirometer (Seahorse Bioscience) using transfected INS832/13 cells and isolated rat islets after infection with adeno- or lenti-virus constructs. After basal respiration measurement for 20 min, glucose levels were elevated to 10 mM (INS cells) or 16 mM (islets). After incubations for 20 min or 1h (INS cells and islets, respectively), oligomycin, FCCP and antimycin/rotenone were added by three successive injections to assess uncoupled respiration, maximal respiration and non- mitochondrial respiration, respectively.

Gluconeogenesis and glycolysis in hepatocytes. For gluconeogenesis determination, after infection with adeno- or lenti-viral constructs, hepatocytes were starved in DMEM without glucose for 2h, followed by incubation in glucose-free DMEM (pH 7.4) without phenol red, supplemented with either 10 mM glycerol or 20 mM sodium lactate plus 2 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine and 15 mM Hepes for 2h. After incubation, the medium was processed for glucose measurement. Glycolysis was assessed by both lactate content and lactate release measurement, since lactate is considered a reliable index of steady state glycolysis in isolated hepatocytes in culture (41).

Adenovirus and lentivirus infection of islets and hepatocytes. Islets and hepatocytes were infected with recombinant adenovirus (MOI of 100) expressing GFP alone (control) or human G3PP (Vector Biolabs), both under CMV promoter control, to overexpress these proteins. In order to knockdown endogenous G3PP, we used rat G3PP-shRNA lentivirus (MOI of 5), with a GFP-shRNA lentivirus as control (abm[®]). Experiments were performed 48 h post infection.

G3PP-adenovirus administration to rats. Male rats (85–100g) were housed in individual cages

and given free access to standard diet. Rats received a single injection of adenovirus (5.5×10^{10} viral particles/ml/100g BW) carrying the genes of either human G3PP (Adv-hG3PP) or GFP (Adv-GFP) as control, by tail vein. Rats were given FK506 (0.2 mg/kg BW) on the day before and on the day of the virus administration to minimize the immune response. Food consumption and body weight were monitored daily for 7 days following virus injection. Then, food was withdrawn for 12h from the rats and a glycerol load test was performed. Rats were sacrificed and blood and different tissues were collected for analyses.

Oral glycerol load test. Rats injected with Adv-G3PP or Adv-GFP, were fed chow diet for 1 week and on the 7th day food was withdrawn for 12 h. Then, 87% glycerol (5 mg/g BW) was administered orally. Blood was collected from tail vein before and at 5, 10, 20, 30, 50 and 60 min following glycerol load and blood glucose was measured using glucometer.

PGP/G3PP protein expression and activity *in vitro*. Purified recombinant murine PGP/ G3PP (18) was assayed using EnzChek Phosphate Assay Kit (Invitrogen/Molecular Probes). The reaction mix in a volume of 100 μ l, containing 50 mM triethanolamine-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (pH 7.5), and indicated concentrations of glycerol-3-phosphate, was pre-incubated for 10 min at room temperature. The reaction at 37°C was started by the addition of 1 μ g purified PGP/ G3PP, and phosphatase activity was then monitored by measuring absorbance at 360 nm in a microplate reader (Spectramax plus 384, Molecular Devices) and corrected for background absorbance. Human PGP/ G3PP in extracts of overexpressing 293T cells (10 μ g cell extract protein) or control INS832/13 cells (30 μ g cell extract protein) was assayed using Phosphate Colorimetric Assay Kit (BioVision Incorporated). The reaction mix (final volume, 200 μ l) containing 50 mM triethanolamine-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (pH 7.5), indicated concentrations of glycerol-3-phosphate, 2-phosphoglycolate and glucose-6-phosphate, were pre-incubated for 30 min at 37°C with shaking and the reaction was started by the addition of G3PP overexpressed or control extracts and continued for 10 min. Phosphatase activity was monitored by measuring the absorbance at 650 nm on a microplate reader (Greiner Bio-one). To derive K_M and K_{cat} values, the data were fit by nonlinear regression to the Michaelis Menten equation using GraphPad Prism.

Targeted metabolomics in rat hepatocytes. After infection with adeno- or lenti-viral constructs, primary hepatocytes were starved without glucose in DMEM for 2h, followed by

incubation in glucose-free DMEM (pH 7.4) without phenol red, supplemented with either 5 or 25 mM glucose for 2h. After incubation, medium was removed and metabolism rapidly quenched by transferring culture plates in liquid nitrogen. Metabolites were extracted as described previously (31) with the following modifications. Cells were scraped on ice and collected in 675 μ l ice-cold extraction buffer (80% methanol, 13.7 mM ammonium acetate pH 9.0 with 10 μ M [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]-adenosine-5'-monophosphate lithium salt as internal standard), transferred into polypropylene (PP) tubes and sonicated in a cup-horn sonicator at 150 W for 2 min (cycles of 10 s on, 10 s off) in an ethanol-ice bath. Cell extracts were centrifuged at 4°C for 10 min at $25,830 \times g$ and supernatants were collected in ice-cold 2 ml PP tubes to which 250 μ l water were added. Polar metabolites were extracted with 1080 μ l of chloroform:heptane (3:1, v/v) by 2 x 10 s vortex followed by 10 min incubation on ice and 15 min centrifugation at 4°C, 12,500g. From the upper phase, 600 μ l were collected without carrying out any interface material and transferred into new cold 2 ml PP tubes. These tubes were centrifuged again and 400 μ l supernatant were collected into cold 1.5 ml PP tubes. Samples were frozen in liquid nitrogen and dried in 2 steps: first in a SpeedVac Concentrator for ~2 h (Savant; maximal vacuum, no heat) at 4°C to remove methanol; second, by lyophilization for 90 min (Labconco FreeZone) and then stored at -80°C until used. Samples were reconstituted in 14 μ l of milli-Q water and injections of 3 μ l were performed in duplicate on a LC-ESI-MS/MS system composed of an Agilent 1200 SL (LC) and a triple quadrupole mass spectrometer (4000Q TRAP MS/MS, Sciex). Samples were separated by gradient elution of 12 min on a Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 75mm, 2.7 μ m column (Agilent Technologies) using mobile phase consisting of an aqueous solvent A (10 mM tributylamine, 15 mM acetic acid, pH 5.2) and an organic solvent B (95% acetonitrile in water, 0.1% formic acid), at a flow rate of 0.75 mL/min and column oven temperature of 40°C. The MS was operated in negative electrospray ionization mode using a turbo ion spray source. Transitions used were described previously (31), with the addition of 154.75/78.79, CE-18 for 2-phosphoglycolate. Quantification was performed as described before (31).

Statistical analysis. Values are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was calculated with one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni or Dunnett's post hoc testing for multiple comparisons or the Student's t test, as indicated. A *P* value of <0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research to MP and SRMM and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB688 and Forschungszentrum FZ82 to AG. M.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Metabolism. YM is supported by a fellowship from Fond de recherche Santé Québec (FRQS). We also thank the “Metabolomics core facility” of the CRCHUM for performing the metabolite determinations.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YM and SZ performed most of the experiments and YM participated in writing the manuscript. YM, SZ, CA, JI, SG, AA, DZ, JL and PP performed in vivo and ex vivo experiments. AS and AG performed the experiments with purified G3PP/PGP. MLP and EJ participated in the design of in vivo experiments and interpretation of the data. AS and AG helped in the interpretation of the structural data. SRMM and MP designed and supervised the project, interpreted the data and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTEREST

The authors do not declare any competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Identification of phosphoglycolate phosphatase as a glycerol-3-phosphate phosphatase and its effect on glycerol release in rat islets and INS832/13 β cells

(A and B) Glycerol and FFA release (2h) by isolated rat islets at 4, 10, 16 and 25 mM glucose with and without 50 μ M orlistat. Means \pm SEM of 4 independent experiments with triplicate observations. ** P <0.01; *** P <0.001.

(C and D) Alignment of murine phosphoglycolate phosphatase (mPGP) and glycerol-3-phosphate phosphatase (G3PP) of *M. tuberculosis* (*Rv1692*). (C) There is very high degree of sequence homology ($P < 4e-20$) and all the active-site residues (in red) match exactly. (D) The cap-domains, which determine substrate specificity (in orange for mPGP and grey for *Rv1692*) align near perfectly as does the critical leucine residue at position 204 in PGP and 155 in *Rv1692* (shown with a black arrow in panel C).

(E) Kinetics of Gro3P hydrolysis by purified mPGP. Mean \pm SEM from 8 experiments. (F) Purified mPGP hydrolyzes Gro3P more effectively than related compounds. Mean \pm SEM of 5 experiments. Gro3P, *sn*-glycerol-3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GA3P, D,L-glyceraldehyde-3-phosphate; 3PG, D(-)3-phosphoglycerate; creatine-P, creatine phosphate; G-6-P, glucose-6-phosphate; ribose-5P, ribose-5-phosphate.

(G) Kinetics of Gro3P, 2-phosphoglycolate (2-PG) and glucose-6-phosphate (G-6-P) hydrolysis by overexpressed human G3PP in 293T cell extracts. Mean \pm SEM; n=4.

(H) Kinetics of Gro3P hydrolysis by native rat G3PP in INS832/13 cell extracts. Mean \pm SEM; n=4.

(I and J) RNAi knockdown of PGP/ G3PP in INS832/13 cells reduces glucose induced glycerol release. (I) PGP/G3PP protein expression 48h after transfection with 20nM and 50nM G3Pase siRNA or control siRNA C1 and C2 or in not transfected cells (NT). (J) Glycerol release (2h) with and without RNAi knockdown at 2, 5, 10 and 20 mM glucose. Mean \pm SEM; n = 4; ** P < 0.01 vs control (CTL) cells.

(K and L) Overexpression of hG3Pase in INS832/13 cells enhances glucose induced glycerol release. (K) hPGP/ G3PP protein expression after transfection with GFP and G3PP expression plasmids and in non transfected cells. (L) Glycerol release at 2, 5, 10 and 20 mM glucose. Mean \pm SEM; n = 4; ** P < 0.01; *** P < 0.001 vs GFP control cells.

Figure 2. Activity of G3PP controls glucose stimulated insulin secretion, glucotoxicity and glucolipotoxicity in β -cells.

(A and B) Insulin secretion in INS832/13 cells at 2 and 10 mM glucose, after G3PP knockdown (A) or hG3PP overexpression (B). NT, not transfected; CTL, control. Mean \pm SEM of 3 experiments with triplicate observations. * P <0.05; ** P <0.01 compared to corresponding controls.

(C and D) Insulin secretion in isolated rat islets at 4 and 16 mM glucose, after G3PP knockdown (C) or hG3PP overexpression (D). Mean \pm SEM of 3 experiments with triplicate observations. * P <0.05; ** P <0.01 compared to corresponding controls.

(E and F) Glucose-induced apoptosis (glucotoxicity) in INS832/13 cells, after G3PP knockdown for 24h (E) or hG3PP overexpression for 72h (F). Caspase activity was determined in cells exposed to 5 and 20 mM glucose. Mean \pm SEM of 3 experiments with triplicate observations. * P <0.05 compared to corresponding controls.

(G) Glucose plus palmitate induced apoptosis (glucolipotoxicity) in INS832/13 cells, after G3PP RNAi-knockdown without or with rescue by hG3PP overexpression. Controls were set-up with control siRNA for knockdown and GFP for overexpression. Glucolipotoxicity was induced for 48h by 20 mM glucose plus 0.3 mM palmitate and compared to 5mM glucose value. Means \pm SEM of 3 experiments with triplicate observations. * p <0.05; ** p <0.01 compared to corresponding controls; control siRNA, shG3PP and GFP.

(H) Scheme illustrating the central role of G3PP in intermediary metabolism. Glycerol-3-phosphate formed from glucose metabolism or by the phosphorylation of lipolysis derived glycerol is at the crossroads of intermediary metabolism. G3PP, by controlling glycerol-3-phosphate, plays a central role in the regulation of intermediary and energy metabolism and cellular redox. Ac-CoA, acetyl-CoA; cG3PDH, cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase; Chol-E, cholesterol ester; Chol, free cholesterol; DAG, diacylglycerol; ETC, electron transport chain; FA-CoA, fatty acyl-CoA; FFA, free fatty acid; G3PP, glycerol-3-phosphate phosphatase; GK, glycerokinase; GL/FFA cycle, glycerolipid/ free fatty acid cycle; LPA, lysophosphatidic acid; MAG, monoacylglycerol; mG3PDH, mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase; OxPhos, oxidative phosphorylation; PA, phosphatidic acid; PL, phospholipids; Pyr, pyruvate; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle; TG, triglyceride.

Figure 3. Changes in G3PP expression modulate glucose, lipid and energy metabolism in β -cells

(A and B) Effect on fatty acid esterification at 2 and 10 mM glucose. (A) RNAi knockdown of G3PP and (B) overexpression of hG3PP in INS832/13 cells. DAG, diacylglycerol, TG, triglyceride, PL, phospholipids and LPA, lysophosphatidic acid. siRNA and GFP controls indicated. Mean \pm SEM; n = 9; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

(C) Palmitate oxidation in INS832/13 cells at 2 and 10 mM glucose. NT, not transfected. Mean \pm SEM; n = 6.

(D) FFA release from INS832/13 cells at 2 and 10 mM glucose. Mean \pm SEM; n=6; * P < 0.05.

(E) Glycerol release from rat islets at 4 and 16 mM glucose following RNAi knockdown of G3PP with lentiviral-shG3PP or hG3PP overexpression with adenoviral-hG3PP. NI, not infected. Mean \pm SEM; n = 9; * P < 0.05; ** P < 0.01.

(F and G) Respiration and mitochondrial function in rat islets at 4 and 16 mM glucose following RNAi knockdown of G3PP (F) or hG3PP overexpression (G). Mean \pm SEM; n = 9; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

(H and I) Western blot analysis of G3PP protein in rat islets after RNAi-knockdown (H) or overexpression of hG3PP (I).

Figure 4. Effect of altered G3PP expression on liver metabolism *in vitro*.

(A-L) *In vitro* metabolic experiments with rat primary hepatocytes infected with lentivirus-shG3PP and control lentivirus-shGFP for G3PP knockdown (Newsholme et al.), or with adenovirus-hG3PP and control adenovirus-GFP for overexpression of hG3PP (F–J). Mean \pm SEM; n = 6–8; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 compared to shGFP or GFP controls.

(A and F) Gluconeogenesis from glycerol or pyruvate/ lactate;

(B and G) Palmitate oxidation at 5 and 25 mM glucose (5G and 25G);

(C and H) Glycerol release;

(D and I) Lactate production (intra cellular content);

(E and J) Lactate release;

(K and L) Fatty acid esterification using 1-¹⁴C-palmitate. 1,2(2,3)-Diacylglycerol (DAG) and triglyceride (TG) synthesis in hepatocytes with G3PP knockdown (K) or with hG3PP overexpression (L).

Figure 5. Effect of altered G3PP expression on metabolite levels in primary rat hepatocytes.

(A-K) Targeted metabolomics of rat primary hepatocytes infected with adenovirus-hG3PP (hG3PP) and control adenovirus-GFP (GFP) for overexpression of hG3PP or with lentivirus-shG3PP (shG3PP) and control lentivirus-shGFP (shGFP) for G3PP knockdown. After infections, hepatocytes were incubated at either 5 or 25 mM glucose for 2h. Then the cells were processed for metabolite measurements as described in Methods. Metabolite content is expressed as nmol/mg protein. (A) Gro3P; (B) DHAP; (C) Gro3P/DHAP ratio; (D) Lactate; (E) Pyruvate; (F) Lactate/pyruvate ratio; (G) NADH; (H) NAD⁺; (I) NADH/NAD⁺; (J) 2-phosphoglycolate (2-PG); (K) ATP. Mean ± SEM; n = 6; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001, as compared to shGFP or GFP controls.

Figure 6. *In vivo* study of the effect of hG3PP overexpression . Rats were injected with adenovirus expressing hG3PP (n=6) or GFP (n=5) and on day 7, glycerol load test was performed. Expression of hG3PP in liver was assessed and plasma glycerol and TG levels were measured prior to glycerol load. Mean ± SEM; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

(A) hG3Pase mRNA and (B) hG3PP protein levels (representative Western blots from three separate rats).

(C) Body weight and (D) net body weight gain in 7 days after adenoviral administration.

(E) Cumulative food intake.

(F) Plasma glycerol and (G) triglyceride levels on day 7 after virus injection in 12h fasted rats, prior to glycerol load.

(H) Glycerol load test in rat expressing hG3PP or control GFP, to assess glycerol-derived glucose production. Blood was collected at indicated times following gavage of glycerol.

References

1. Nye CK, Hanson RW, & Kalhan SC (2008) Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *The Journal of biological chemistry* 283(41):27565-27574.
2. Zechner R, *et al.* (2012) FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell metabolism* 15(3):279-291.
3. Prentki M & Madiraju SR (2008) Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev* 29(6):647-676.
4. Prentki M & Madiraju SR (2012) Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes. *Molecular and cellular endocrinology* 353(1-2):88-100.
5. Peyot ML, *et al.* (2010) Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes* 59(9):2178-2187.
6. Green CD, Jump DB, & Olson LK (2009) Elevated insulin secretion from liver X receptor-activated pancreatic beta-cells involves increased de novo lipid synthesis and triacylglyceride turnover. *Endocrinology* 150(6):2637-2645.
7. Zhang C, Klett EL, & Coleman RA (2013) Lipid signals and insulin resistance. *Clinical lipidology* 8(6):659-667.
8. Delghingaro-Augusto V, *et al.* (2009) Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia* 52(6):1122-1132.
9. Nolan CJ, *et al.* (2006) Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* 49(9):2120-2130.
10. Wilfling F, Haas JT, Walther TC, & Farese RV, Jr. (2014) Lipid droplet biogenesis. *Current opinion in cell biology* 29:39-45.
11. Ditlecadet D & Driedzic WR (2013) Glycerol-3-phosphatase and not lipid recycling is the primary pathway in the accumulation of high concentrations of glycerol in rainbow smelt (*Osmerus mordax*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 304(Consortium et al.):R304-312.

12. Previs SF, *et al.* (1995) Limitations of the mass isotopomer distribution analysis of glucose to study gluconeogenesis. Substrate cycling between glycerol and triose phosphates in liver. *The Journal of biological chemistry* 270(34):19806-19815.
13. Larrouy-Maumus G, *et al.* (2013) Discovery of a glycerol 3-phosphate phosphatase reveals glycerophospholipid polar head recycling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(28):11320-11325.
14. Fan J, Whiteway M, & Shen SH (2005) Disruption of a gene encoding glycerol 3-phosphatase from *Candida albicans* impairs intracellular glycerol accumulation-mediated salt-tolerance. *FEMS microbiology letters* 245(1):107-116.
15. Norbeck J, Pahlman AK, Akhtar N, Blomberg A, & Adler L (1996) Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry* 271(23):13875-13881.
16. Caparros-Martin JA, McCarthy-Suarez I, & Culianez-Macia FA (2014) The kinetic analysis of the substrate specificity of motif 5 in a HAD hydrolase-type phosphosugar phosphatase of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 240(3):479-487.
17. Rose ZB (1981) Phosphoglycolate phosphatase from human red blood cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 208(2):602-609.
18. Seifried A, *et al.* (2014) Evolutionary and structural analyses of mammalian haloacid dehalogenase-type phosphatases AUM and chronophin provide insight into the basis of their different substrate specificities. *The Journal of biological chemistry* 289(6):3416-3431.
19. Lahiri SD, Zhang G, Dunaway-Mariano D, & Allen KN (2006) Diversification of function in the haloacid dehalogenase enzyme superfamily: The role of the cap domain in hydrolytic phosphorus-carbon bond cleavage. *Bioorganic chemistry* 34(6):394-409.
20. Seifried A, Schultz J, & Gohla A (2013) Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *The FEBS journal* 280(2):549-571.

21. Prentki M, Matschinsky FM, & Madiraju SR (2013) Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell metabolism* 18(2):162-185.
22. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, & Roduit R (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3:S405-413.
23. El-Assaad W, *et al.* (2010) Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells. *Endocrinology* 151(7):3061-3073.
24. Christoffersen C, *et al.* (2003) Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 144(8):3483-3490.
25. Vaughan M (1962) The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *The Journal of biological chemistry* 237:3354-3358.
26. Wendel AA, Cooper DE, Ilkayeva OR, Muoio DM, & Coleman RA (2013) Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)-1, but not GPAT4, incorporates newly synthesized fatty acids into triacylglycerol and diminishes fatty acid oxidation. *The Journal of biological chemistry* 288(38):27299-27306.
27. Frayn KN (2010) Fat as a fuel: emerging understanding of the adipose tissue-skeletal muscle axis. *Acta physiologica* 199(Consortium et al.):509-518.
28. Thai M, *et al.* (2014) Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell metabolism* 19(Consortium et al.):694-701.
29. Bardell D (1977) Glucose uptake and lactic acid production of adenovirus type 5-infected HEp-2 cells cultured under exponential growth and stationary phase conditions. *Microbios* 20(81-82):139-144.
30. Berry MN, Barritt GJ, & Edwards AM (1991) *Isolated Hepatocytes. Preparation, Properties and Applications* (Elsevier) p 460.
31. Guay C, *et al.* (2013) A role for cytosolic isocitrate dehydrogenase as a negative regulator of glucose signaling for insulin secretion in pancreatic ss-cells. *PloS one* 8(10):e77097.
32. Chen B, *et al.* (2007) GC/MS methods to quantify the 2-deoxypentos-4-ulose and 3'-phosphoglycolate pathways of 4' oxidation of 2-deoxyribose in DNA: application to

- DNA damage produced by gamma radiation and bleomycin. *Chem Res Toxicol* 20(11):1701-1708.
33. Knight J, Hinsdale M, & Holmes R (2012) Glycolate and 2-phosphoglycolate content of tissues measured by ion chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 421(1):121-124.
 34. de Groot MJ, de Jong YF, Coumans WA, & van der Vusse GJ (1994) The hydrolysis of glycerol-3-phosphate into glycerol in cardiac tissue: possible consequences for the validity of glycerol release as a measure of lipolysis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 427(1-2):96-101.
 35. Ditlecadet D & Driedzic WR (2014) Glycerol synthesis in freeze-resistant rainbow smelt: towards the characterization of a key enzyme glycerol-3-phosphatase. *Fish physiology and biochemistry* 40(1):257-266.
 36. Moriyama M, *et al.* (2015) Mechanism for increased hepatic glycerol synthesis in the citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse: Urine glycerol and glycerol 3-phosphate as potential diagnostic markers of human citrin deficiency. *Biochimica et biophysica acta* In Press.
 37. Madiraju AK, *et al.* (2014) Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510(7506):542-546.
 38. Peyot ML, *et al.* (2009) Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *The Journal of biological chemistry* 284(25):16848-16859.
 39. Hohmeier HE, *et al.* (2000) Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49(3):424-430.
 40. Zhao S, *et al.* (2014) alpha/beta-Hydrolase domain-6-accessible monoacylglycerol controls glucose-stimulated insulin secretion. *Cell metabolism* 19(6):993-1007.
 41. Phillips JW, Clark DG, Henly DC, & Berry MN (1995) The contribution of glucose cycling to the maintenance of steady-state levels of lactate by hepatocytes during glycolysis and gluconeogenesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 227(1-2):352-358.

42. Merlen G, *et al.* (2014) AMPK α 1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. *Journal of hepatology* 60(1):152-159.
43. Puttmann M, Krug H, von Ochsenstein E, & Kattermann R (1993) Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. *Clinical chemistry* 39(5):825-832.
44. Mehta A, Oeser AM, & Carlson MG (1998) Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 719(1-2):9-23.
45. Bradley DC & Kaslow HR (1989) Radiometric assays for glycerol, glucose, and glycogen. *Analytical biochemistry* 180(1):11-16.
46. Friedewald WT, Levy RI, & Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 18(6):499-502.
47. Segall L, *et al.* (1999) Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *The American journal of physiology* 277(3 Pt 1):E521-528.
48. Saddik M & Lopaschuk GD (1991) Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *The Journal of biological chemistry* 266(13):8162-8170.
49. Lamontagne J, *et al.* (2009) Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic beta-cell at submaximal glucose concentrations. *Endocrinology* 150(8):3465-3474.
50. Qiang L, *et al.* (2012) Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparg γ . *Cell* 150(3):620-632.
51. Maughan RJ (1982) A simple, rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20- μ l blood sample. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 122(2):231-240.

SUPPORTING INFORMATION

SI Table of Contents

1. Figure S1
2. Figure S2
3. Figure S3
4. Figure S4
5. SI Figure Legends
6. SI Materials and Methods
7. SI References

SI FIGURE LEGENDS

Figure S1. Lipolysis independent release of glycerol in INS832/13 cells and structural alignment of mouse phosphoglycolate phosphatase with bacterial and yeast glycerol-3-phosphatases.

(A and B) Effect of panlipase inhibitor orlistat on glycerol and FFA release in INS832/13 cells at different glucose concentrations. (A) Release of glycerol and (B) FFA following 2h incubation with and without 50 μ M orlistat. Means \pm SEM of 3 experiments with triplicate observations; * P <0.05.

(C) A structural overlay of fusion protein of catalytic core of pyridoxal phosphate phosphatase (PDXP) with mouse PGP/G3PP (Protein Data Bank (PDB) Identification: 4BKM) and mycobacterial G3PP, Rv1692 (PDB ID: 4I9F). Glycerol-3-phosphate (G3P) shown was modeled on the basis of the structure of putative yeast G3PP cocrystallized with bound G3P (haloacid dehalogenase like phosphatase; 3RF6 in PDB). The zoom in the substrate binding pocket shows that the critical and evolutionarily conserved cap domain residues involved in substrate coordination are identical between mouse PGP/ G3PP and the newly discovered mycobacterial G3Pase. Furthermore, the orientation of these residues is comparable.

(D) Reduction of PGP/G3PP in INS832/13 cells with three separate siRNAs is associated with lowered glycerol release. Upper panel: siRNA 1, 2 and 3 reduce the PGP/ G3PP protein level as compared to the control siRNAs C1 and C2. NT, not transfected. Lower panel: Effect of various G3Pase siRNA on glycerol release. G3PP-siRNA1 and control siRNA-1 were used for rest of the study. Means \pm SEM of 3 experiments with triplicate observations; *** P <0.001 compared with C1 and C2.

(E and F) Overexpression of hG3PP counters the effect of PGP/G3PP RNAi-knockdown on glycerol release and insulin secretion in INS832/13 cells. (E) Glycerol release at 2 and 10 mM glucose in cells transfected with G3PP-siRNA or control si-RNA, and with plasmid expressing GFP or hG3PP or empty vector. (F) Insulin secretion measured at 2 and 10 mM glucose in cells transfected with G3PP-siRNA or control si-RNA, and with plasmid expressing GFP or hG3PP. Means \pm SEM of 3 independent experiments with triplicate observations. * P <0.05; ** P <0.01 *** P <0.001 compared with corresponding controls.

Figure S2. Regulation of G3PP expression by nutritional status in mice and tissue distribution of G3PP in rats.

(A and B) G3PP expression in the fed and fasted states in various tissues. Male mice were fed normal chow diet and one group was starved overnight before sacrifice. Tissues were isolated and G3PP expression was measured. (A) G3PP mRNA levels normalized to corresponding tissue cyclophilin mRNA. (B) G3PP protein expression in different tissues assessed by Western blots and densitometry. G3PP protein levels were normalized to corresponding tissue levels of β -actin or α -tubulin and expressed as fold change in expression. Means \pm SEM; n=6; * P <0.05.

(C and D) Effect of high-fat diet on G3PP expression in various tissues. Male mice were fed normal diet (ND) or high fat diet (HFD, 60% calories from fat) for 8 weeks and then sacrificed, and tissues were collected for assessing G3PP expression. (C) G3PP mRNA levels. (D) G3PP protein levels. Means \pm SEM; n=5-10; * P <0.05; ** P <0.01. Sk. muscle, skeletal muscle; BAT, brown adipose tissue; VAT, visceral adipose tissue; SAT, subcutaneous adipose tissue.

(E) Expression of G3PP mRNA in normal Wistar rat tissues and in the rat β -cell line IN832/13. Means \pm SEM; n=4.

(F) Expression of G3PP protein in different rat tissues. Representative blot of 3 experiments.

Figure S3. Altered G3PP expression in INS832/13 cells affects lipid and energy metabolism.

(A and B) Fatty acid esterification to 1,3-DAG, lysophosphatidylinositol (LPI) and lysophosphatidylcholine (LPC). (A) RNAi knockdown of G3PP and (B) overexpression of hG3PP. Fatty acid esterification was measured using [1- 14 C]-palmitate at 2 and 10 mM glucose.

(C and D) Oxygen consumption, ATP production and H^+ leak. Respiratory measurements in transfected cells were made at 2 and 10 mM glucose, using Seahorse XF-analyzer and ATP production and H^+ leak were calculated. (C) RNAi-knockdown of G3PP and (D) hG3PP overexpression.

Means \pm SEM; * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 versus GFP or control siRNA groups; n=12.

Figure S4. Effect of altered G3PP expression in rat primary hepatocytes on lipid metabolism (Collard et al.) and effect of Adv-G3PP overexpression *in vivo* on plasma LDL and HDL levels (Sluse et al.).

(Collard et al.) Rat primary hepatocytes were infected with lentivirus-shG3PP and control lentivirus-shGFP for G3PP knockdown or with adenovirus-hG3PP and control adenovirus-GFP for overexpression of hG3PP.

(A and B) Western blot analysis of G3PP expression after RNAi-knockdown (A) and hG3PP overexpression (B).

(C and D) Fatty acid esterification using 1-¹⁴C-palmitate. (C) Cholesterol ester (CE) and phospholipid (PL) synthesis with G3PP knockdown. (D) Cholesterol ester (CE) and phospholipid (PL) synthesis with hG3PP overexpression.

Means \pm SEM; n=6; * P <0.05 compared to shGFP or GFP.

(E and F) Low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) levels in the plasma of rats 6 days after injection with Adv-G3PP (n=6) or Adv-GFP control. Means \pm SEM; n=5; * P <0.05 vs Adv-GFP.

(G) Western blot analysis of G3PP expression in different tissues, with α -tubulin as loading control. Representative blots of 3 hG3Pase- and 3 GFP-adenovirus-injected rats. VAT, visceral adipose tissue; BAT, brown adipose tissue; RBC, red blood cells.

SI MATERIALS AND METHODS

Animals. Five-week-old male C57BL/6N mice and Wistar rats (85-250g) were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). Mice and rats were housed 3–4 per cage and 2 per cage, respectively, on a 12-h light/dark cycle at 21°C with free access to water and standard diet (Teklad Global 18% protein rodent diet; Harlan Teklad, Madison, WI, 15% fat by energy). One week after arrival, mice were fed with either the standard or high fat diet (HFD; 60% calories from fat; Bio-Ser Diet #F3282, Frenchtown, NJ) for 8 weeks. To evaluate the effect of feeding and fasting on glycerol-3-phosphate phosphatase (G3PP) expression, ad libitum fed and overnight fasted mice were sacrificed and different tissues were collected for analyses.

Islet and hepatocyte isolation. Pancreatic islets were isolated from Wistar rats and C57Bl6N mice by collagenase (type XI from Sigma) digestion of total pancreas (Peyot et al., 2009b). Isolated islets were cultured overnight at 37°C in complete RPMI 1640 medium. Hepatocytes were isolated from Wistar rats by *in situ* collagenase (type XI from Sigma) perfusion and were seeded in DMEM complete medium (Merlen et al., 2014).

Insulin secretion in islets and INS832/13 cells. Insulin secretion in INS832/13 cells (Hohmeier et al., 2000) and isolated islets was measured in static incubations (Peyot et al., 2009b). INS832/13 cells were cultured in 12-well plate for 36h in complete RPMI medium with 11 mM glucose, and then transferred to medium containing 2 mM glucose for 2h. Then the cells were washed in Krebs Ringer buffer-Hepes (KRBH) containing 2 mM glucose, 2mM glutamine, 50 µM carnitine and 0.5% defatted BSA (KRBH 2G/0.5%BSA) and pre-incubated for 45 min in KRBH 2G/0.5%BSA. This was followed by static incubations for 1h in KRBH with 0.5% defatted BSA, containing glutamine, carnitine and various concentrations of glucose, for measuring insulin release. For insulin secretion from islets, batches of 100 islets were starved 45 min in KRBH medium with 4 mM glucose, 2 mM glutamine, 50µM carnitine and 0.5% defatted BSA and then washed in KRBH containing 4 mM glucose and 0.5% defatted BSA (KRBH 4G/0.5%BSA), and pre-incubated for 45 min in KRBH 4G/0.5%BSA. Islets were then incubated for 1h in KRBH with 0.5% defatted BSA containing glutamine, carnitine and different concentrations of glucose, to measure insulin release. At the end of the incubations, media were collected and proteins were extracted from cells or islets. Insulin released into medium was determined by AlphaLISA assay (PerkinElmer).

Over-expression and RNAi knockdown of G3PP in INS 832/13 cells. The pCMV-based plasmids (Origene) expressing human G3PP (PGP, phosphoglycolate phosphatase; SC311252) and Green Fluorescent Protein (GFP; PS100010) were introduced into INS832/13 cells using the lipofectamine (Life Technologies). After transfection, cells were cultured for 48h in 96-well, 12-well or 6-well plates. Silencer select pre-designed siRNA against G3PP (rat PGP) and two scrambled-siRNA were obtained from Ambion (G3PP: s220489; scrambled-siRNA-1: 4390844 and scrambled-si-RNAi-2: 4390847). The sequences for G3PP used were 5'-AGGCGGACAUCAUCGGGAAtt-3' and 5'-UUCCCCGAUGAUGUCCGCCUgg-3'. siRNA constructs were introduced into INS832/13 cells by reverse transfection using RNAiMAX and used 48h after transfection (Zhao et al., 2014). Transfected cells were used for Western blotting and measurements of insulin secretion, caspase activity, glycerol and free fatty acids (Sluse et al.) release, oxygen consumption and fatty acid oxidation and esterification.

Immunoblotting. Tissue and cell lysates were prepared and extracted proteins were processed for immunoblotting (Peyot et al., 2009b). Membranes were incubated with antibodies for G3PP/PGP (Santa Cruz Biotechnology, sc-241605, dilution 1:1000). Mouse monoclonal β -actin (dilution 1:10000) and rabbit polyclonal α -tubulin (dilution 1:20000) antibodies were from Sigma and Abcam (Cambridge, MA) respectively.

Quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted from INS 832/13 cells, islets and rodent tissues using the Rneasy Mini kit (Qiagen) with Rnase-free Dnase (Qiagen). First strand cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA in 50 μ l (final volume) of a buffer containing the Pd(N)6 random primers and MMLV reverse transcriptase. RT-qPCR was performed using a Rotor-Gene 3000 (Corbett Robotics) and the PCR products were quantified using the FastStart DNA Master PLUS SYBR green kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Expression levels were normalized for the 18S or cyclophilin mRNA transcript. The primer sequences were: 18S mRNA forward (5'-CTGAGAAACGGCTACCACATC-3'), reverse (5'-GGCCTCGAAAGAGTCCTGTAT-3'); Cyclophilin forward (5'-CTTGCTGCAGACATGGTCAAC-3'), reverse (5'-GCCATTATGGCGTGTGAAGTC-3') mouse G3Pase forward (5'-CTGGACACAGACATCCTCCTG-3'), reverse (5'-TCACTTTCCTGATTGCTCTTCA-3'); and rat G3Pase forward (5'-GACAACCTCCACTCACTCTGC-3'), reverse (5'-AAGTTTAGCTGGGCTGCTGTT-3').

Free fatty acids and glycerol release. For FFA determinations, isolated rat islets were pre-incubated for 1h in KRBH containing 2 mM glutamine and at 4 mM glucose, 50 μ M carnitine and then incubated for 2h at 4, 10, 16 and 25 mM glucose. The low and high glucose concentrations were 2 and 10 mM, respectively, when INS832/13 cells were used. Incubations were done without and with the panlipase inhibitor, orlistat. Cells and islets were harvested after incubations for protein extraction. FFA released into the medium were extracted by a modified Dole-Meinertz extraction procedure (Puttmann et al., 1993). Briefly, the media (0.5 ml), in Pyrex glass tubes, were mixed with the internal standard [$^2\text{H}_{31}$]-palmitic acid and extracted with 2.5 ml of a solvent mixture containing isopropanol-n-heptane-2M phosphoric acid (40:10:1, v/v). After thorough mixing by vortex, the tubes were kept in a bath sonicator (Branson Ultrasonic) and sonicated for 2 min with 30 s intervals, avoiding sample heating. After rigorous mixing by vortex, the tubes were let stand at room temperature for 10 min, and then heptane (1 ml) and water (1.5 ml) were added and the tubes were thoroughly mixed by vortex followed by sonication for 1 min. Then the tubes were centrifuged at 1000 \times g for 10 min at 4°C. An aliquot of 1.5ml (88% of the total organic layer) from the top layer was transferred to 2.0 ml reacti-vials (Supelco) and dried under nitrogen (N-Evap; Organomation, Berlin, MA). The dried fatty acids were derivatized with phenacylbromide and quantified by reverse phase HPLC (Mehta et al., 1998) using a Zorbax Eclipse plus XDB analytical C18 column (4.6 \times 250 mm; 5 μ m; Agilent Technology). FFA were eluted using methanol/water (92.5:7.5, v/v) at a flow rate of 1.5 ml/ min and absorbance of eluting FFA-phenacyl derivatives was measured at 242 and 254 nm. The peaks were identified by their retention times, and the concentrations of individual fatty acids were computed by the internal standard method from peak area using the standard curves of individual FFA. Glycerol release was determined by a radiometric glycerol assay (Bradley and Kaslow, 1989) using [γ - ^{32}P]ATP and glycerokinase.

G3PP-adenovirus administration to rats. Male Wistar rats (85–100g; Charles River) were housed in individual cages and given free access to standard diet. Rats received a single injection of adenovirus (5.5×10^{10} viral particles/ml; 0.1 ml/ 100g BW) carrying the genes of either human G3PP (Ad-hG3PP) or Green fluorescent protein (Ad-GFP) as control, by tail vein. Rats were given FK506 (0.2 mg/kg body weight) on the day before and on the day of the virus administration to minimize the immune response. Food consumption and body weight were monitored daily for 7 days following virus injection. Then, food was withdrawn for 12h and

glycerol load test performed as described below. Rats were sacrificed and blood was collected by heart puncture and different tissues were collected and were clamp frozen and stored at -80°C till further analysis.

Plasma chemistry. Triglycerides and glycerol concentrations were measured using a quantitative enzymatic colorimetric assay kit (Sigma). Blood glucose and insulin levels were measured as described before (Zhao et al., 2014). Plasma low density lipoprotein and high density lipoproteins were assessed using a quantitative enzymatic colorimetric assay kit (Wako, L-Type LDL-C) (Friedewald et al., 1972).

Fatty acid esterification and oxidation in INS832/13 cells and rat hepatocytes. INS832/13 cells were transfected with plasmids expressing hG3PP or GFP (control) or siRNA targeting G3PP or control siRNA, as described above. Fatty acid (FA) esterification and oxidation in the transfected INS832/13 cells were measured after incubating the cells as for insulin secretion experiments, as described above. Then for FA oxidation, the cells were incubated in KRBH containing 0.1 mM unlabeled palmitate, 2 $\mu\text{Ci/ml}$ [9,10- ^3H]palmitate (51 Ci/mmol, Amersham Biosciences) plus 0.5% defatted BSA, 1 mM carnitine, and 2 or 10 mM glucose. Esterification of FA was followed under similar incubation conditions, with 0.2 mM unlabeled palmitate, 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ [1- ^{14}C]palmitate (57.5 mCi/mmol; Amersham Biosciences), plus 0.5% defatted BSA. Primary hepatocytes (0.2 million cells/ well in 12-well plate for FA oxidation and 0.5 million cells/ well in 6-well plate for FA esterification) were first preincubated for 45 min in 1 ml of DMEM containing 5 mM glucose. They were then incubated for 2h in 0.5 ml (FA oxidation) or 1 ml (FA esterification) of DMEM with 0.25% defatted BSA, 0.1 mM palmitate (for oxidation, with 2 $\mu\text{Ci/ml}$ [9,10- ^3H]palmitate) or 0.2 mM palmitate (for esterification, with 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ [1- ^{14}C]palmitate), at 5 or 25 mM glucose. For FA esterification determination, at the end of the incubations INS832/13 cells or primary hepatocytes were collected and washed in cold PBS. Total lipids were extracted using Folch reagent (Segall et al., 1999) and separated by TLC using a solvent system (petroleum ether/ether/acetic acid; 70/30/1) to measure the incorporation of labeled palmitate into various lipids species (Nolan et al., 2006a). FA oxidation was determined, by collecting and measuring the released $^3\text{H}_2\text{O}$ into incubation medium (Saddik and Lopaschuk, 1991).

Glucotoxicity and glucolipotoxicity in INS832/13 cells. The effect of either overexpression or

knockdown of G3PP in INS832/13 cells on glucotoxicity and glucolipotoxicity was assessed by culturing the transfected cells in 96-well plate for 48h, followed by replacing the medium with 50 μ l of RPMI 1640 medium supplemented with 1% fetal bovine serum, 0.5% BSA and either 5 or 20 mM glucose with or without 0.3 mM palmitate. Incubations were continued for an additional 24 or 72 h after which caspase-3 activity, which reflects apoptosis, was measured. Incubations with 5 mM glucose in the absence of palmitate served as controls. Total caspase-3 activity in each well was determined by using the Caspase 3/7 Luminescent Assay kit (Caspase-Glo, Promega, Madison, WI) and normalized to the DNA content in each well, measured with SYBR green I (Molecular Probes) (El-Assaad et al., 2010).

Oxygen consumption and mitochondrial function in INS 832/13 cells and islets. Respiration measurements *in vitro* were made using a XF24 respirometer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). Transfected INS832/13 cells were seeded 48h before the experiments at 5×10^4 cells/well in XF24 microplates. Media were changed 2h before the experiments with complete RPMI 1640 containing 2 mM glucose as described before (Lamontagne et al., 2009). Isolated rat islets after infection with adeno- or lenti-virus constructs, were transferred to XF24 islet capture microplates (75 islets/well) 3h before the experiments, in RPMI 1640 containing 4 mM glucose, 2mM glutamine and 50 μ M carnitine. Incubations at 37°C under atmospheric CO₂ were for 1h for INS cells and 25 min for islets, in KRBH without BSA and bicarbonate. Basal glucose concentration was 2 mM for INS cells and 4 mM for rat islets. After basal respiration measurement for 20 min, glucose levels were elevated to 10 mM (for INS cells) or 16 mM (for islets). After incubations for 20 min or 1h (for INS cells and islets, respectively), oligomycin, FCCP and antimycin/rotenone were added by three successive injections. We used the F₁F₀ ATP synthase inhibitor oligomycin to assess uncoupled respiration, FCCP to estimate maximal respiration and antimycin/rotenone to measure non- mitochondrial respiration (Qiang et al., 2012).

Gluconeogenesis and glycolysis in hepatocytes. After infection with adeno- or lenti-viral constructs, primary hepatocytes were starved in DMEM without glucose for 2h, and then washed with PBS (37°C), followed by incubation for 2h in glucose production buffer consisting of glucose-free DMEM (pH 7.4) without phenol red, supplemented with 15 mM Hepes and 2 mM L-glutamine, either with 10 mM glycerol or 20 mM sodium lactate plus 2 mM sodium pyruvate. Then, the medium was processed for glucose measurement (Autokit Glucose Wako). Glycolysis

was assessed by measuring lactate production. Virus-infected primary hepatocytes were starved as described above and incubated in phenol red-free DMEM (buffered with HEPES pH 7.4), 2 mM L-glutamine and 2 or 25 mM glucose. Lactate accumulated in the cells and released into the medium was measured separately as described before (Maughan, 1982).

Adenovirus and lentivirus infection of islets and hepatocytes. Islets and hepatocytes were infected with either recombinant adenoviruses or lentivirus at a multiplicity of infection of 100 or 5 respectively, 48h before utilization. For islet adenoviral infection, after isolation islets were incubated with Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 5 mM glucose, 1 mM EGTA at 37°C for 3 min before infecting with recombinant adenoviruses: 200 islets per well in a 6-well plates for overnight at 37°C. Hepatocytes adenoviral infection was made with 0.2 million cells/well in 12-well plates and 0.5 million cells/well in 6-well plates. Both islets and hepatocytes were infected with recombinant adenovirus expressing GFP alone (control) or human G3PP (Vector Biolabs), both under CMV promoter control, to overexpress these proteins. In order to knockdown endogenous G3PP, we used rat G3PP-shRNA lentivirus, with a GFP-shRNA lentivirus as control (abm[®]). The conditions of infection with lentiviruses were similar as for adenoviruses.

Oral glycerol load test. Rats injected with G3PP or GFP expressing adenovirus were fed chow diet for 1 week and on the 7th day, food was withdrawn for 12 h (from 18:00 until 06:00 the following day) prior to administration of glycerol load. Then, 87% glycerol (5 mg/g BW) was administered orally. Blood was collected from tail vein before glycerol load and blood glucose was measured at 5, 10, 20, 30, 50 and 60 min following glycerol load using an Accu-Chek Sensor glucometer (Roche).

Structural overlay studies. Structural comparison of the 'cap' domain of mammalian PGP/G3PP/AUM with that of mycobacterial G3PP Rv1692 was made employing the earlier described crystal structure of hybrid protein between pyridoxal phosphate phosphatase, (PDXP) catalytic domain and the cap domain of PGP/AUM (Seifried et al., 2014). This hybrid protein structure was resolved at 2.65 Å resolution (PDB entry 4BKM). Crystal structure of Rv1692 is available in Protein data Bank (PDB ID: 4I9F). The structural alignments were made by PyMolWiki and the figures of structural overlay were generated with PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4, Schrödinger, LLC.).

Statistical analysis. Values are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was calculated with one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni or Dunnett's post hoc testing for multiple comparisons or the Student's *t* test, as indicated. A *P* value of <0.05 was considered significant.

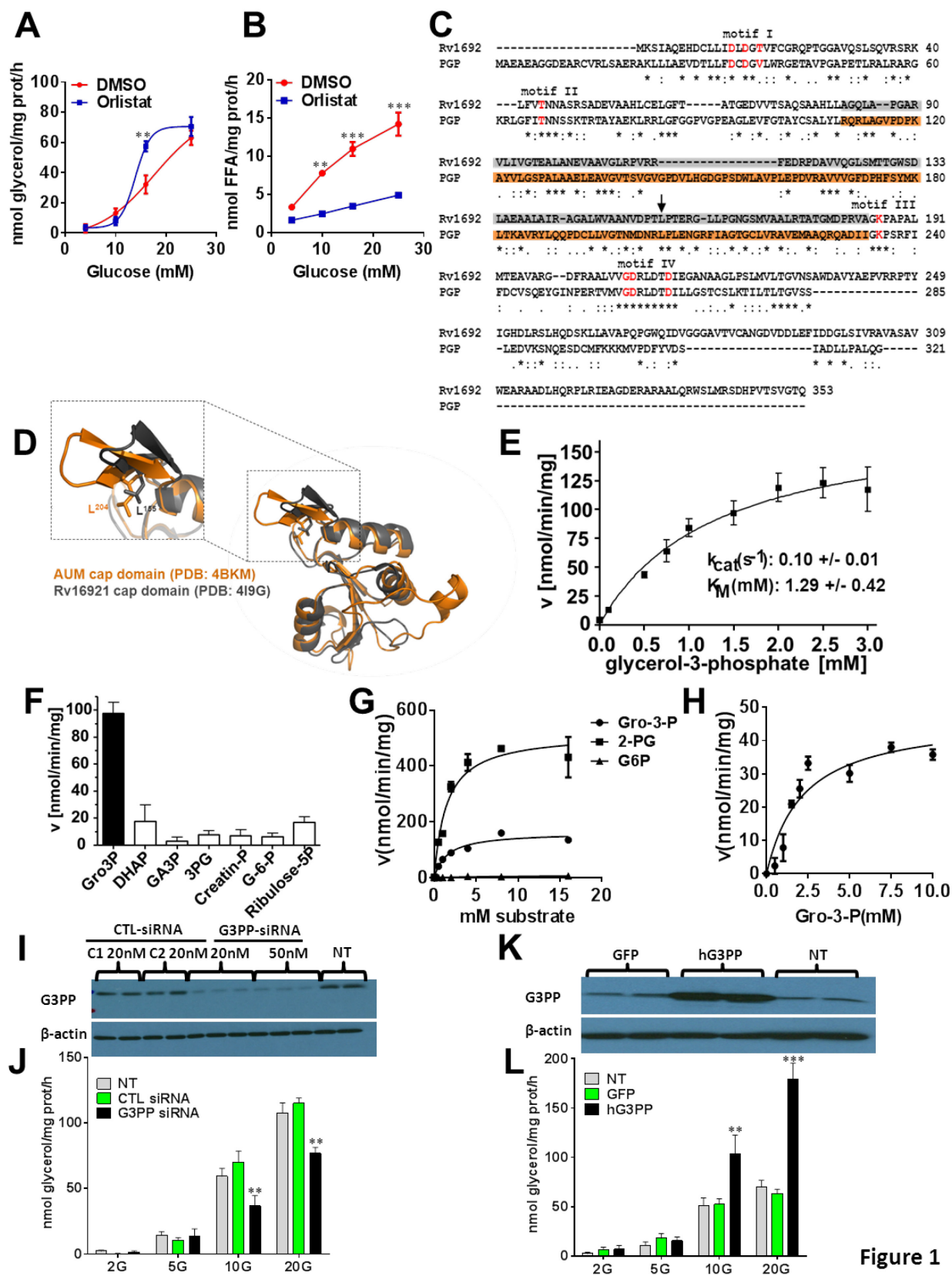


Figure 1

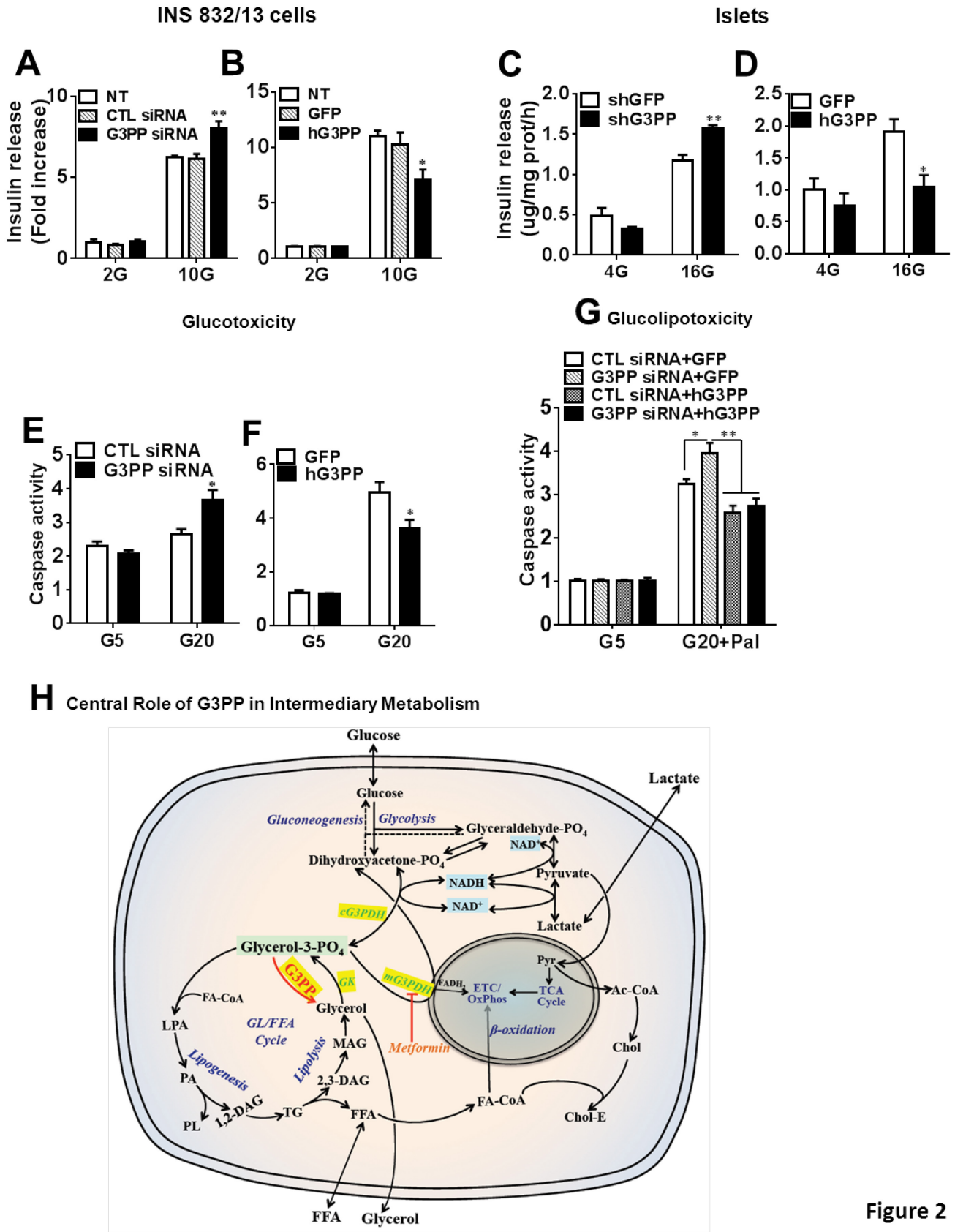


Figure 2

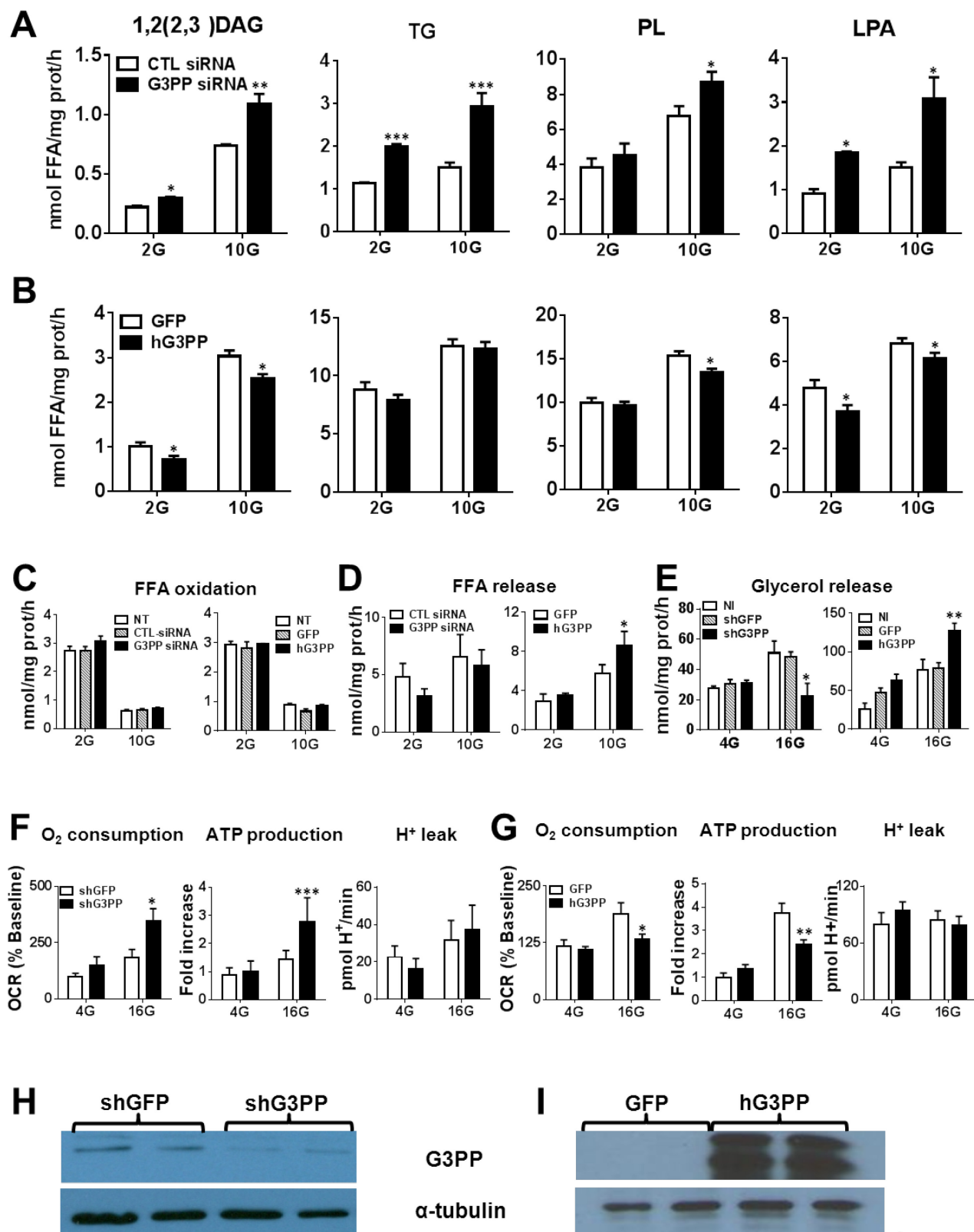


Figure 3

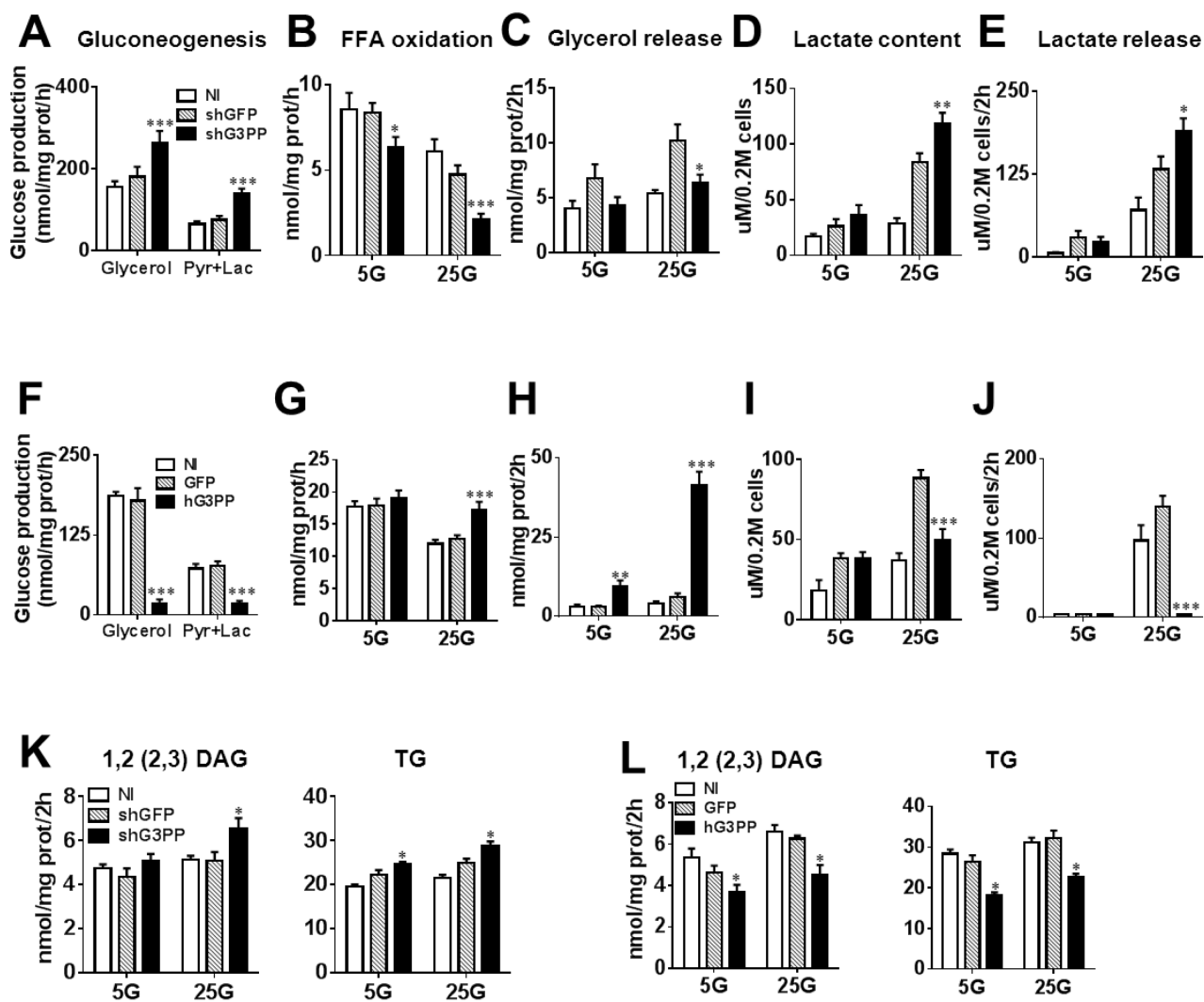


Figure 4

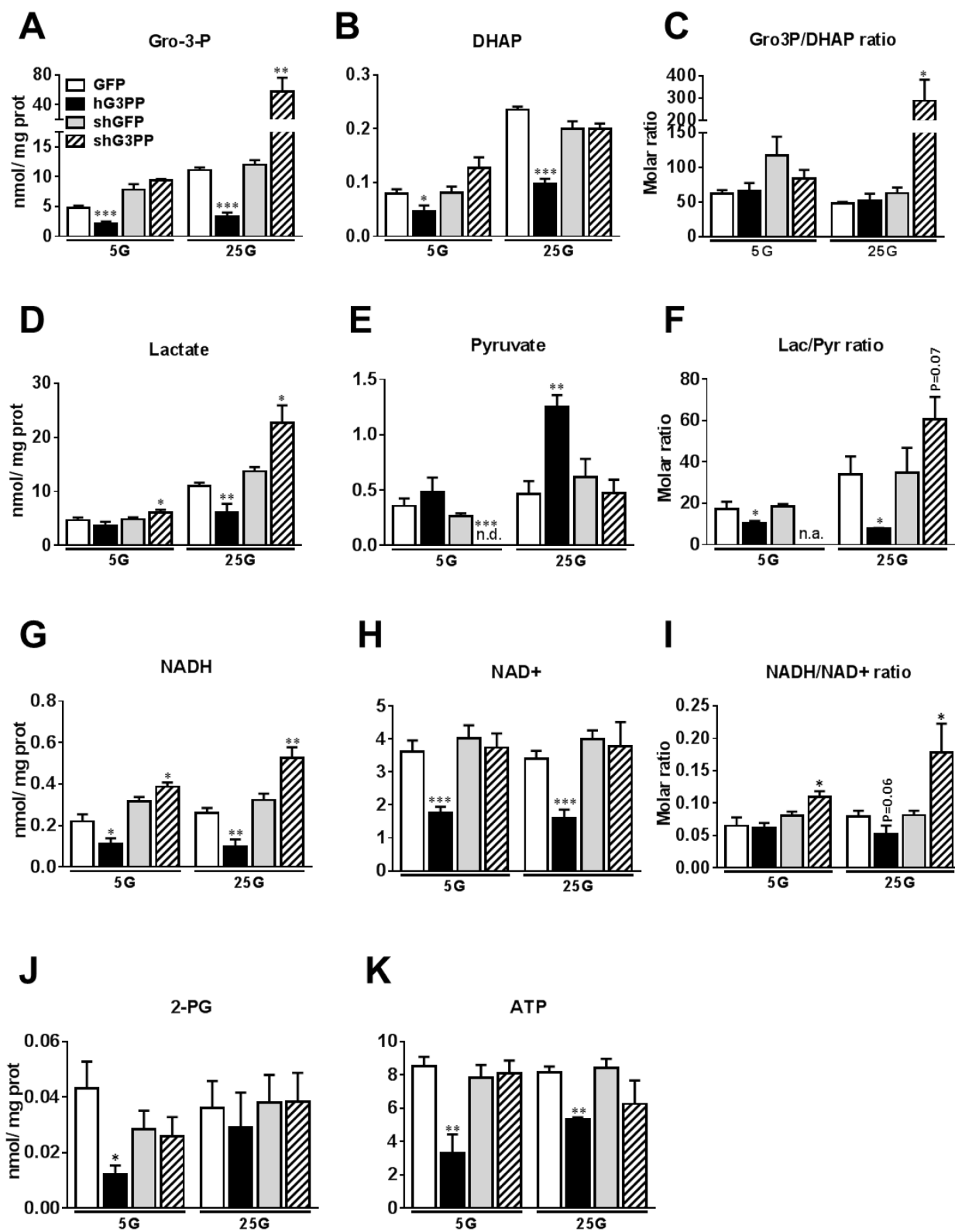


Figure 5

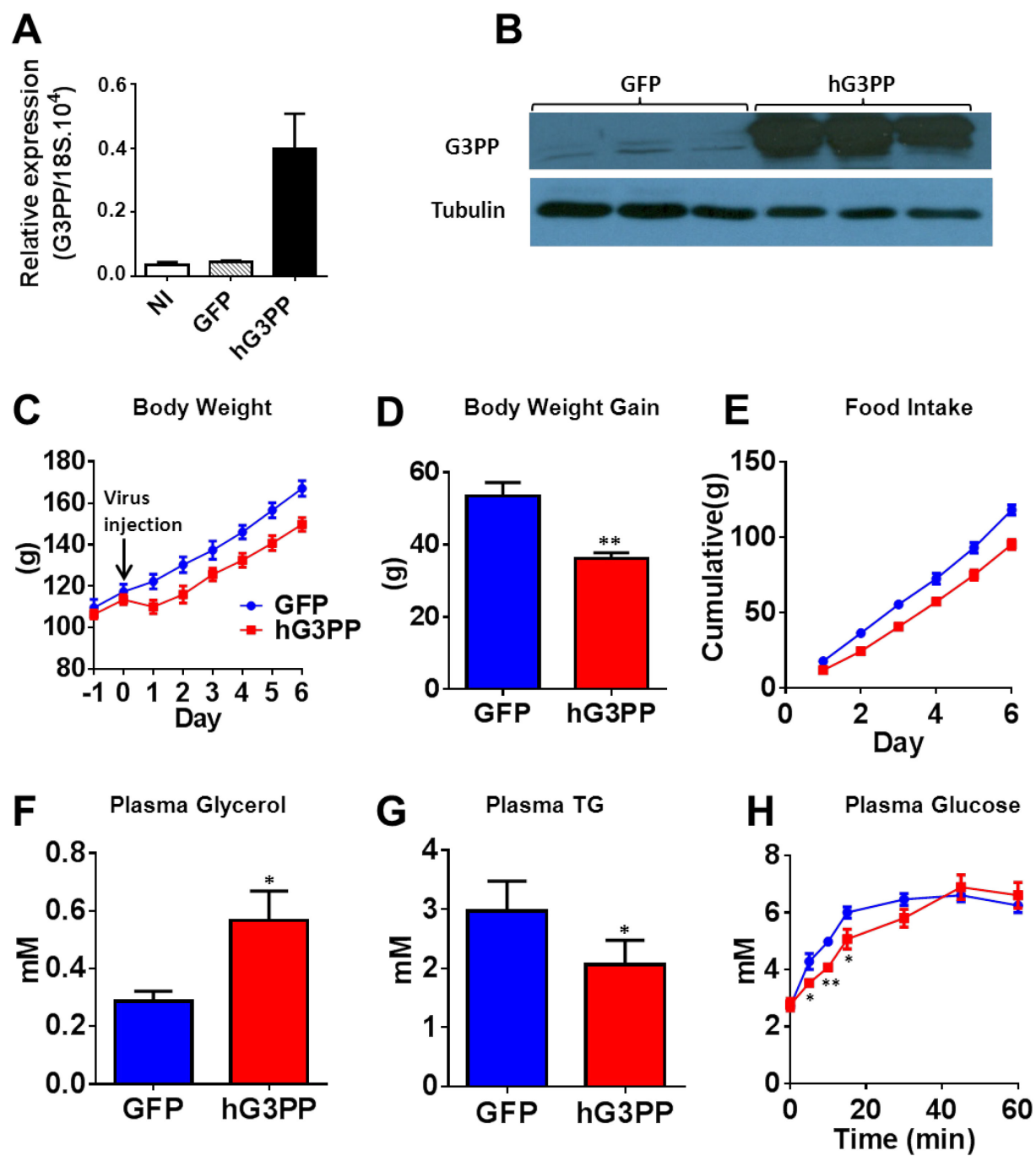


Figure 6

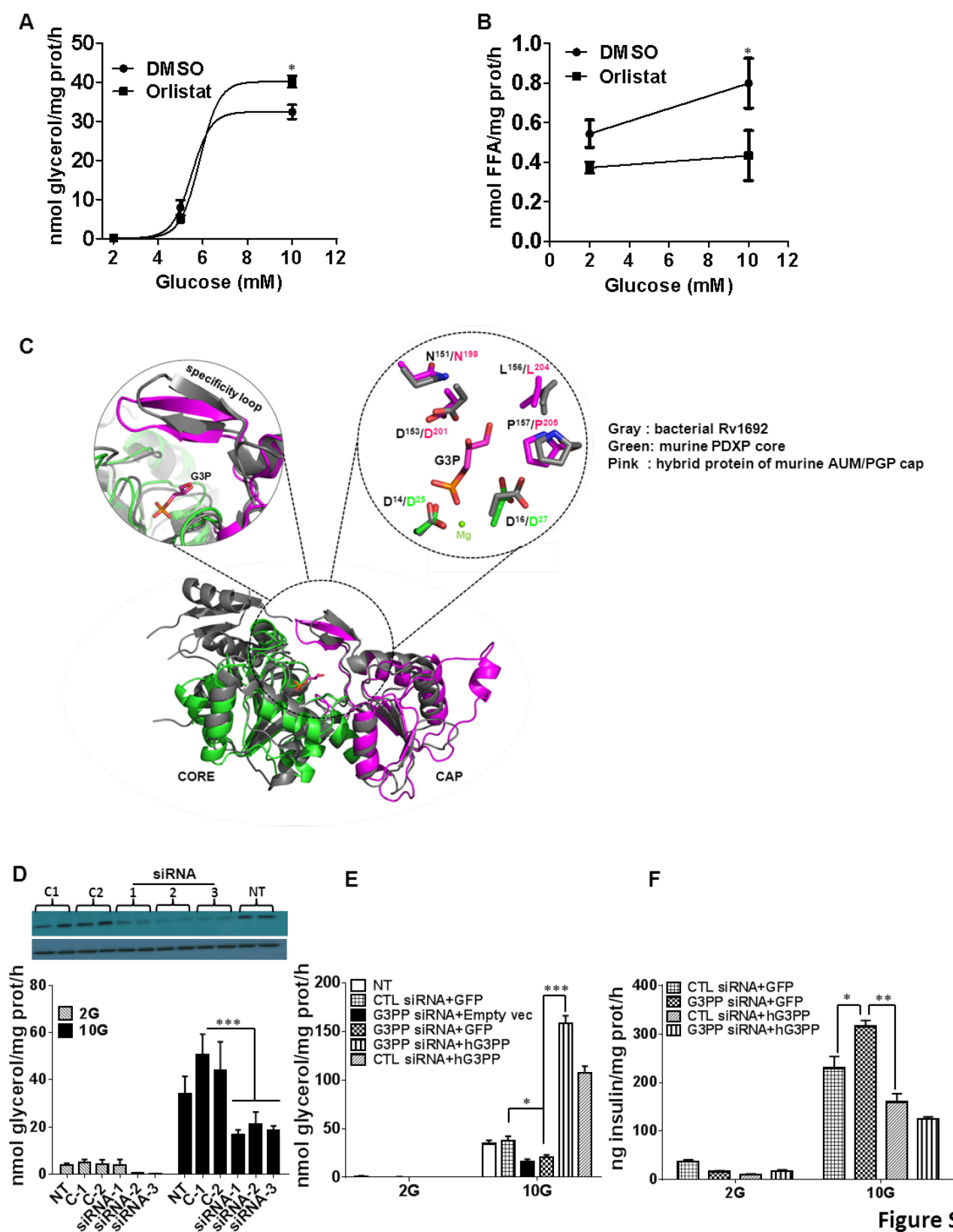


Figure S1

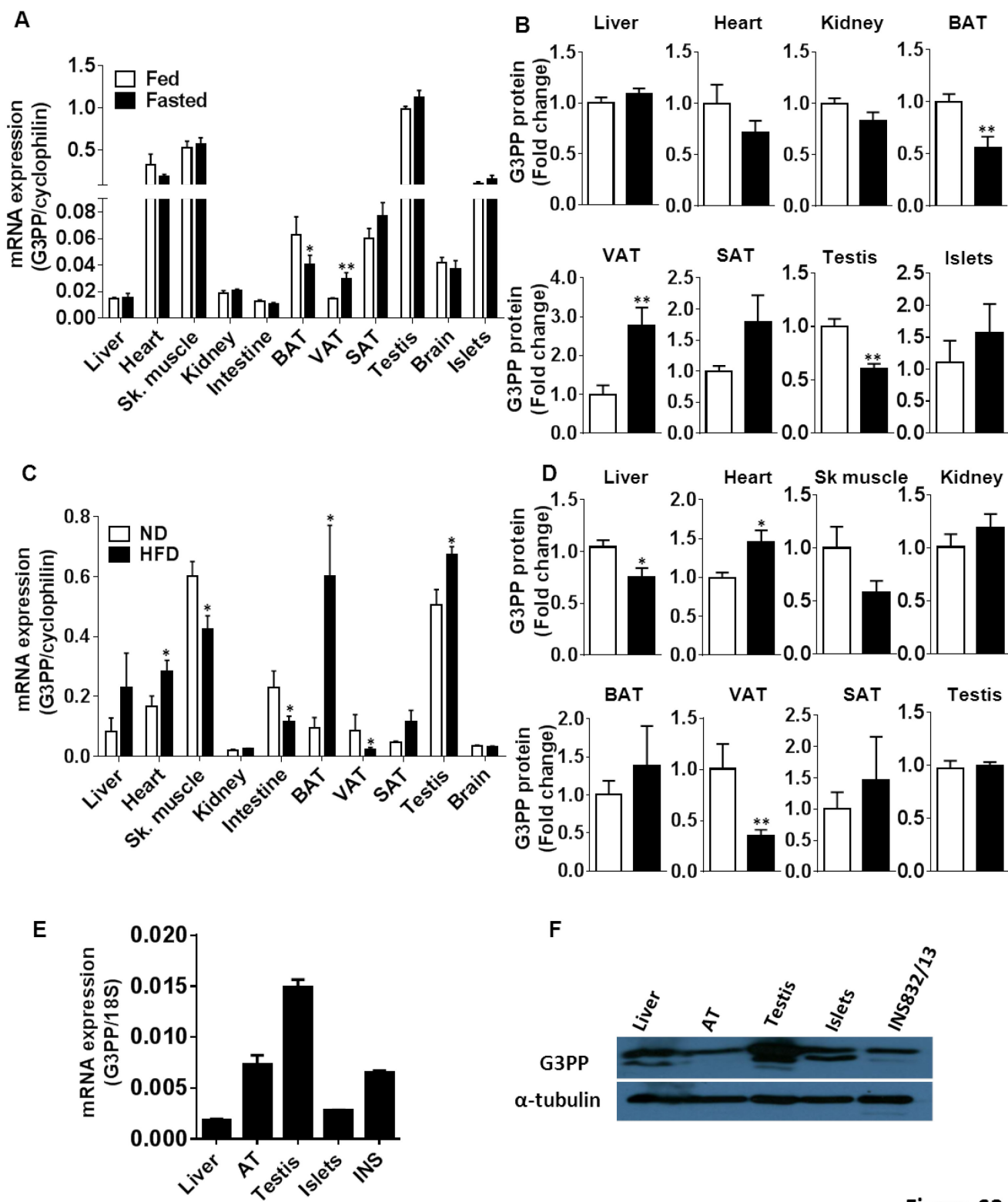


Figure S2

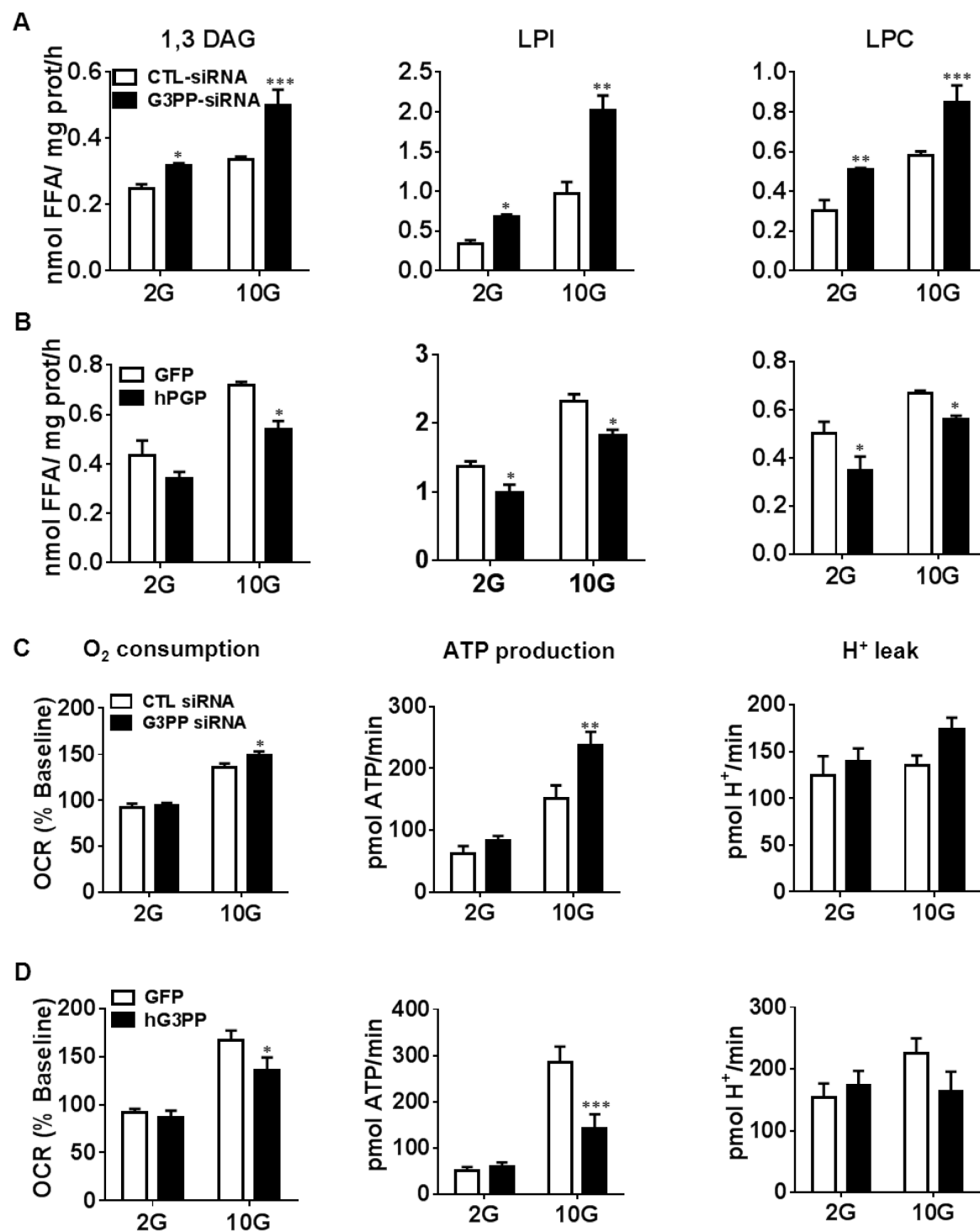


Figure S3

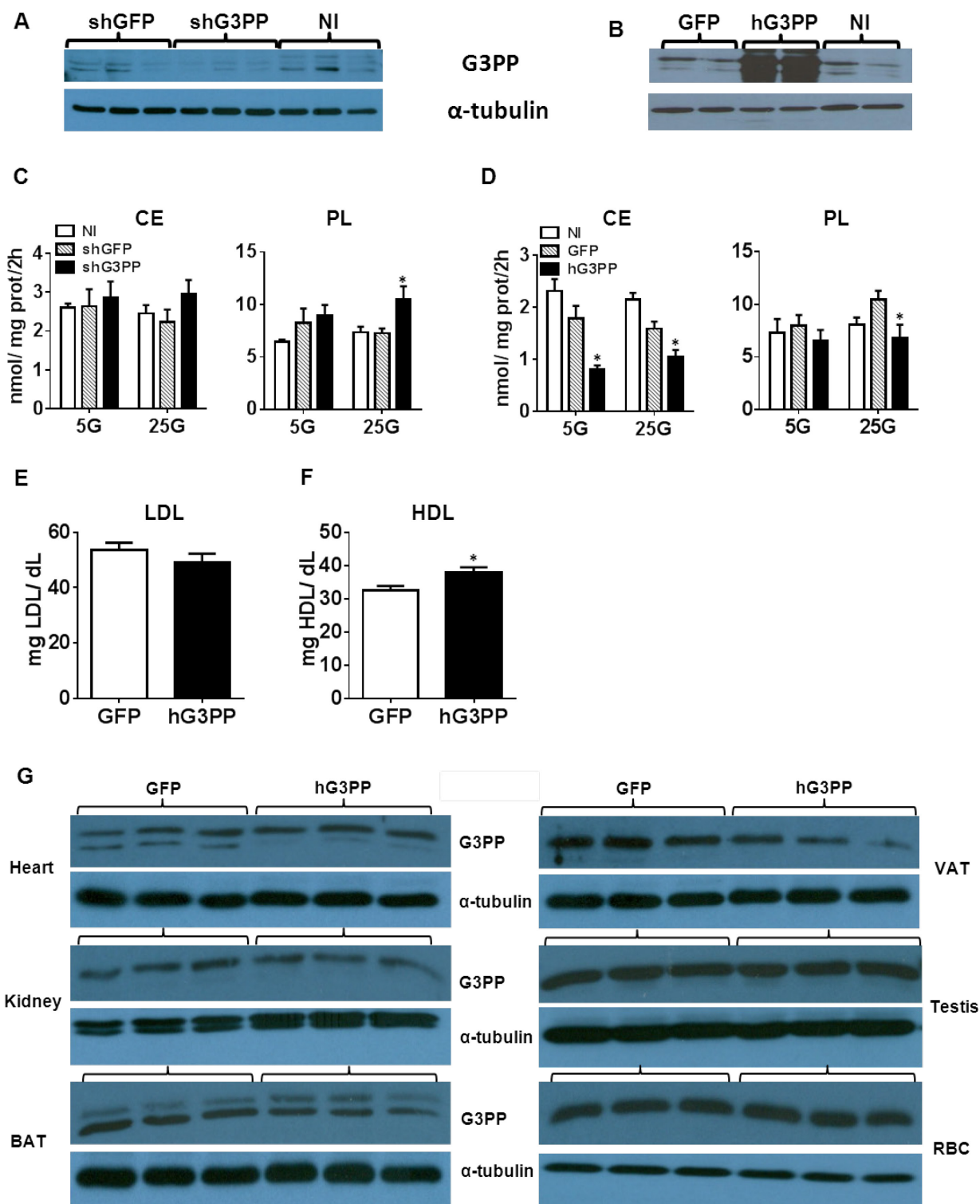


Figure S4

3. DISCUSSION

3. DISCUSSION

Les cellules possèdent des mécanismes pour éliminer les molécules « étrangères » comme les toxines, médicaments et autres xénobiotiques. En revanche les mécanismes impliqués dans la détoxification des nutriments et de leurs dérivés en excès sont dans l'ensemble méconnus quel que soit le type cellulaire. Dans la première étude, nous avons examiné différentes voies de détoxification candidates dans la cellule β en mesurant le devenir métabolique possible du glucose à plusieurs concentrations. À la lumière de nos résultats, nous suggérons qu'une augmentation graduelle de la concentration externe de glucose active des voies de signalisation impliquées dans la sécrétion d'insuline et la production d'énergie, et aussi des voies impliquées dans des processus de glucodétoxification. Ces derniers processus sont suggérés parce qu'ils ne saturent pas en réponse au glucose contrairement aux voies de signalisation. Les processus de «glucodétoxification» candidats que nous suggérons impliquent: 1) l'augmentation des formes de stockage d'énergie plus « inertes » (triglycérides, glycogène et les esters de cholestérol); 2) la libération extracellulaire de métabolites dérivés du glucose (glycérol, cholestérol et FFA); et 3) une stimulation des processus métaboliques du cycle GL/FFA. Aussi, on a pu constater que certains métabolites intracellulaires provenant du métabolisme du glucose corrélaient bien soit avec la SIIG (par exemple, le fumarate, le malonyl-CoA et le malate) soit avec l'utilisation du glucose (par exemple, le glycérol, et les FFA), suggérant en effet, qu'ils sont des métabolites clé dans la cascade de signalisation métabolique du glucose pour la sécrétion d'insuline ou qu'ils pourraient être impliqués dans la glucodétoxification, respectivement.

Quand nous avons souhaité étudier l'implication de la partie lipolytique du cycle GL/FFA dans la glucodétoxification, on a constaté un effet dichotomique de l'orlistat, un inhibiteur bien connu de la lipolyse, qui inhibait complètement la libération des FFA et non celle du glycérol chez des îlots isolés de rats exposées à des niveaux élevés de glucose, suggérant que le glycérol peut avoir une source autre que lipolytique. La seule autre origine possible du glycérol semblait être l'hydrolyse directe du Gro3P provenant de la glycolyse. Cette observation nous a mené à notre deuxième étude dans laquelle nous avons postulé l'existence d'une activité Gro3P phosphatase (G3PP) chez les mammifères. Cette activité provient en fait d'une enzyme identifiée auparavant, la phosphoglycolate phosphatase (PGP) pour laquelle la fonction chez les cellules de mammifère demeure énigmatique. Nous avons montré que la PGP pouvait transformer directement le Gro3P en glycérol. En utilisant les techniques de génétiques moléculaires, nous

avons trouvé que PGP, en contrôlant les niveaux du Gro3P, régule la glycolyse, la gluconéogenèse, la synthèse des glycérolipides, le métabolisme mitochondrial, l'état redox, et l'oxydation des acides gras dans la cellule pancréatique β et les hépatocytes. Elle module aussi la SIIG ainsi que la glucolipotoxicité dans la cellule pancréatique β de rat. Dans le foie, la surexpression *in vivo* de la PGP via l'injection d'adénovirus recombinants diminue le gain de poids et la production hépatique du glucose à partir du glycérol, et augmente les niveaux de HDL plasmatiques. Comme nous le verrons en détails plus loin, nos travaux suggèrent que dans la cellule pancréatique β certaines voies métaboliques peuvent jouer un rôle important dans la détoxification des nutriments en excès. De plus, nos travaux ont mis en lumière le rôle de plusieurs métabolites et voies métaboliques impliqués dans le SIIG et/ou les processus de détoxification. Par la suite, nous avons mis en évidence une enzyme clé, la PGP, pouvant transformer directement le Gro3P en glycérol chez les mammifères et par conséquent jouant un rôle essentiel dans la régulation métabolique des cellules.

Métabolisme et signalisation métabolique du glucose : distinction des voies métaboliques impliquées dans la glucodétoxification et dans la sécrétion d'insuline dans la cellule pancréatique β

Métabolites et voies métaboliques impliqués dans la glucodétoxification

Afin de protéger la cellule β contre les effets délétères du glucose à haute concentration, nous avons émis l'hypothèse de l'existence de processus de détoxification et que ces processus font intervenir des voies métaboliques pour transformer les carbones du glucose en molécules plus inertes et/ou exportables pour ainsi éliminer l'excès du glucose. L'existence et la nature précise de ces voies métaboliques impliquées dans la détoxification des nutriments calorigéniques est inconnue. Dans la première partie de la thèse, on a tenté d'identifier des voies métaboliques et métabolites possiblement impliqués dans les processus de glucodétoxification. En présence de concentrations élevées d'un substrat potentiellement toxique, une voie de détoxification idéale devrait fonctionner de manière continue ne présentant peu ou pas de saturation ou du moins saturerait à des concentrations très élevées du substrat. Une augmentation linéaire de l'activité d'une telle voie de détoxification en fonction de la concentration du nutriment potentiellement toxique, atténuerait de manière efficace la toxicité du nutriment sans perturber le métabolisme cellulaire normal. Chez les cellules β , cette augmentation linéaire d'activité contrasterait avec la

fonction de sécrétion d'insuline qui dépend aussi de certaines voies métaboliques mais qui sont saturables. Comme attendu, nous avons observé que la sécrétion d'insuline sature à des concentrations de glucose autour de 16 mmol/l de glucose dans les îlots isolés de rat. Parallèlement, les mesures de l'oxydation du glucose, production d'ATP, la respiration mitochondriale (consommation d'oxygène) montrent aussi une saturation à des concentrations de glucose autour de 16 mmol/l. En revanche, nous avons observé que les mesures d'utilisation du glucose, de libération du glycérol, de synthèse du glycogène, de synthèse et la libération des FFA ainsi que la synthèse et le stockage des triglycérides et du cholestérol et de ses esters augmentent de façon linéaire jusqu'à 25 mmol/l de glucose sans montrer de saturation. Ceci suggère que les cellules β de rats éliminent « l'excédent » de glucose via la synthèse et la libération du glycérol et des FFA en plus des formes de stockages inertes telles que les triglycérides. Les îlots de rats permettent l'entrée continue de glucose et utilisent ce dernier pour sécréter l'insuline par une augmentation du métabolisme du glucose et qu'une fois les processus métaboliques (par exemple l'oxydation mitochondriale du glucose) de sécrétion sont saturés (autour de 16 mmol/l glucose), le glucose peut néanmoins être transformé en certains dérivés de manière continue. Par exemple, l'utilisation du glucose (mesuré via le flux passant par l'énolase de la glycolyse), la production du glycérol et du lactate (du moins chez les cellules INS832/13), et l'accumulation de glycogène, sont quatre processus et métabolites dérivant directement de la glycolyse qui augmentent linéairement avec la concentration de glucose, et qui indiquent que la glycolyse et certaines voies métaboliques ne sont pas saturables à glucose même très élevé, tout au moins jusqu'à 25 mmol/l dans les îlots de rat. L'utilisation du glucose corrèle aussi avec la synthèse et la libération des FFA, la synthèse du cholestérol et des TG.

Ainsi, la cellule β semble utiliser plusieurs processus et voies métaboliques pour continuellement sentir les variations extracellulaires de glucose en faisant entrer ce dernier de manière continue. Les carbones du glucose sont utilisés pour permettre la sécrétion d'insuline via l'oxydation du glucose et la production d'ATP et d'autres voies telles l'anaplérose, et leurs excès sont transformés en métabolites plus inertes et/ou exportés de la cellule.

Il est important de noter qu'à ce jour une quantification relative des voies possibles de détoxification du glucose n'a pas été effectuée dans la cellule β et c'est ce que nous avons tenté dans cette thèse. Nos résultats suggèrent qu'une proportion significative du glucose entrant dans

les cellules β à haute concentration est rendue inoffensive par le détournement de son métabolisme vers la synthèse et le stockage des lipides, en particulier les TG et esters du cholestérol, et la synthèse et la libération des FFA et du glycérol. Plusieurs études ont également montré des changements des contenus en TG (MacDonald et al., 2008; Zhou et al., 1996), de la synthèse et la libération des FFA (MacDonald et al., 2008; Martins et al., 2004) et de la teneur en cholestérol (MacDonald et al., 2008) en réponse à l'augmentation des concentrations de glucose dans les îlots, mais aussi dans d'autres types cellulaires (Xue et al., 2010), ce qui suggère que ces mécanismes de détoxification pourrait avoir lieu non seulement dans les cellules β mais aussi dans d'autres types cellulaires. Certaines de ces études ont montré une association entre les changements des profils lipidiques et une forme de protection en présence des niveaux élevés de nutriments calorigéniques. En effet, Listenberger et al., (Listenberger et al., 2003) ont montré que les acides gras insaturés avaient une fonction de protection contre la lipotoxicité via une augmentation de l'accumulation des triglycérides. De plus, Cnop et al., ont observé une corrélation inverse entre l'accumulation des triglycérides et la mort cellulaire, suggérant que les triglycérides sont probablement non toxiques (Cnop et al., 2001). Bosma et al., ont pu démontrer aussi qu'une séquestration de FFA sous forme de triglycérides prévenait un stress du réticulum endoplasmique (Bosma et al., 2014). Le rôle protecteur des esters du cholestérol comparé au cholestérol libre est quant à lui bien établi (Newsholme et al., 2007).

Nous avons vu que le glycérol augmente également linéairement avec la concentration du glucose. Ce dernier est produit par deux sources : les processus de lipolyse du cycle TG/FFA et l'hydrolyse directe du glycérol-3-phosphate par la G3PP (Mugabo et al., 2016). Dans la cellule β , la contribution de la lipolyse dans la libération du glycérol stimulée par le glucose est importante seulement à des concentrations intermédiaires de glucose (Mugabo et al., 2016) et donc une grande partie du glycérol proviendrait de l'activité de la G3PP. Les cellules β ne possèdent (ou très peu) de glycérol kinase et donc le glycérol ainsi produit ne peut pas être retransformé en glycérol-3-phosphate. Il est donc probablement exporté des cellules par les aquaporines (AQP) 7 et 9 pour être capté par le foie et retransformé.

Le glycogène augmente aussi linéairement avec les concentrations de glucose et nos résultats suggèrent que le glycogène pourrait être une voie significative de détoxification du glucose. Plusieurs études ont déjà suggéré une augmentation des niveaux du glycogène à des niveaux

élevés de glucose dans les îlots pancréatiques (Doherty and Malaisse, 2001; Ladriere and Malaisse, 2001; Rasschaert and Malaisse, 2001). Le groupe de Malaisse a suggéré que dans des situations d'hyperglycémie prolongée, une plus grande quantité de glycogène s'accumule dans les cellules β des îlots pancréatiques que dans d'autres types cellulaires du pancréas (Ladriere and Malaisse, 2001). Ce même groupe a proposé qu'une accumulation du glycogène pourrait jouer un rôle protecteur contre la glucotoxicité dans la cellule β en prévenant l'augmentation d'un éventuel flux glycolytique attribuable à une utilisation du glucose exogène (Malaisse et al., 1992). Donc, une augmentation des niveaux du glycogène à des niveaux élevés de glucose peut être une voie métabolique candidate de gluco-détoxication d'autant plus qu'il s'agit d'une forme de stockage plus inerte que le glucose libre. Aussi, il a été montré que l'AMP-kinase (AMPK), une protéine impliquée dans la détection et la préservation des niveaux énergétiques cellulaires, était régulée en partie par son association avec le glycogène (Halse et al., 2003). De plus cet enzyme est impliqué dans la protection contre les effets négatifs des nutriments calorigéniques (Steinberg et al., 2006). Il serait intéressant d'examiner plus à fond le rôle de cette enzyme et du glycogène dans notre modèle expérimental et la glucodétoxication.

Plusieurs études ont montré que les carbones du glucose pouvaient être dirigés vers la synthèse des FFA via la biosynthèse *de novo* et dans l'élongation de ces derniers, aussi bien dans la cellule β que d'autres types cellulaires et que cette proportion augmente avec des concentrations de glucose (Brun et al., 1996; Fruhbeck, 2005). Nos résultats indiquent que les îlots convertissent une quantité importante de glucose en FFA et exportent une partie importante (~50% des FFA produits) hors de la cellule sous forme de stéarate et de palmitate. Ceci est en accord avec le fait que, lorsque les cellules β sont exposées à des quantités élevées de glucose, les FFA étant produit *de novo* (par exemple, le palmitate) sont continuellement repris et rallongés par des élongases en utilisant des unités acétyles dérivé du glucose pour en faire du palmitate et du stéarate. Dans la cellule β on privilégie surtout l'élongation des FFA puisqu'il existe très peu de FAS.

Le cholestérol libre est essentiel pour de nombreuses fonctions cellulaires et pour la fluidité membranaire, mais tout comme les FFA, il devient toxique lorsqu'il est présent en grande quantité (Kellner-Weibel et al., 1998; Lu et al., 2011). Cette accumulation excessive du cholestérol est normalement contrôlée via son estérification avec des FFA par l'acyl-CoA: cholestérol acyltransférase-1 pour produire du CE, qui est ensuite transporté hors de la cellule

(Yokoyama, 2000). De plus, il a été démontré que la suppression de l'ATP-binding cassette transporteur-A1 (ABCA1) qui facilite l'efflux de cholestérol chez la cellule β causait une accumulation du cholestérol et CE (Brunham et al., 2007) et une réduction de la sécrétion d'insuline (Brunham et al., 2008). On a pu constater que dans les îlots une partie des carbones du glucose semble se diriger vers le CE et le cholestérol libre en accord avec une étude antérieure par MacDonald et al., qui en employant du glucose marqué, ont pu démontrer qu'à des niveaux élevés de glucose environ 15% des carbones du glucose sont incorporés dans du CE (MacDonald et al., 2008). Cependant, pour mieux comprendre l'importance quantitative des voies de détoxification, on a considéré qu'il était initialement intéressant d'évaluer les quantités absolues et relatives entre elles des métabolites à diverses concentrations de glucose. Néanmoins des études ultérieures de flux métaboliques avec des isotopes stables devraient être effectuées afin de suivre quantitativement le marquage isotopique des carbones du glucose, et non indirectement comme nous l'avons fait.

S'il est bien acquis qu'une consommation excessive d'acides gras et d'hydrates de carbones accroît le risque de maladies chroniques en augmentant la toxicité de nombreux tissus (glucolipotoxicité), les mécanismes responsables de détoxification de ces tissus restent encore peu connus en particulier dans la cellule pancréatique β . La glucolipotoxicité étant induite par l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie, le ciblage des voies de glucolipodétoxification pourrait mener à de nouvelles cibles thérapeutiques possibles et des interventions nutritionnelles chez les patients obèses et diabétiques.

Métabolites et voies métaboliques impliquées dans la sécrétion d'insuline

Suite à des analyses métabolomiques ciblées, nous avons récemment réalisé, en plus d'autres groupes, qu'aux conditions expérimentales usuelles basales (bas glucose) de sécrétion d'insuline *in vitro*, les cellules sont en fait appauvries en énergie et donc que suite à une stimulation par le glucose la plupart des métabolites augmentent sans distinction. Dans de telles conditions, il est difficile d'identifier les véritables facteurs de couplage métaboliques (FCM) pour le SIIG. Par conséquent et contrairement à d'autres études, nous avons utilisé un milieu d'incubation enrichi avec un niveau basal de 4 mmol/l glucose supplémenté en glutamine (2 mmol/l) et en carnitine (50 μ mol/l) (Mugabo et al., 2016) pour les îlots. Comme déjà mentionné plus haut, nos résultats montrent une corrélation entre l'oxydation du glucose et la SIIG: les deux seaturent autour de

16 mmol/l de glucose. Nous avons examiné par la suite si la formation de divers produits spécifiques dérivés du métabolisme du glucose suivent la même cinétique de saturation que la SIIG et pourraient donc être considérés comme FCM candidat pour la sécrétion d'insuline. La production d'ATP, un inhibiteur des canaux potassiques ATP-dépendant (K_{ATP}), suit la même cinétique de saturation que le SIIG et ces résultats confirment le rôle largement accepté de l'ATP en tant que FCM dans la sécrétion d'insuline (Prentki et al., 2013). L'ADP quant à lui a un effet activateur des canaux K_{ATP} via SUR1, un des composant de ces canaux (Drews et al., 2010; Proks et al., 2010), donc inhibiteur de la sécrétion d'insuline. En plus de l'ATP, les ROS ont aussi été proposés comme FCM pour la sécrétion d'insuline (Newsholme et al., 2009; Pi et al., 2007). De manière surprenante, nous avons noté que les niveaux de ROS augmentaient avec le glucose jusqu'à une concentration de 10 mmol/l glucose pour ensuite redescendre à des niveaux de base à 25 mmol/l de glucose. Cette production de ROS en forme de cloche en fonction du glucose suggère l'activation de processus de détoxification des ROS à des concentrations élevées de glucose. Cette interprétation est supportée par les résultats de l'expérience de métabolomique ciblée que nous avons faite dans les cellules INS832/13, où on observe une augmentation du NADPH et du GSH à des concentrations élevées de glucose. Le NADPH est utilisé par le système rédox du glutathion pour éliminer les ROS (Freeman et al., 2006; Wong et al., 2010). Plusieurs études ont montré une augmentation des niveaux des ROS à des concentrations élevées de glucose dans les cellules β (Kim et al., 2007; Llanos et al., 2015a; Pi et al., 2007; Sarre et al., 2012) mais sans pour autant vérifier les niveaux de ROS à différentes concentration de glucose (dose dépendance). Notre étude est la première à démontrer un effet en cloche des niveaux de ROS en fonction de la concentration du glucose dans la cellule β . Les études précédentes ont donc manqué l'effet de différents niveaux élevés de glucose que nous avons observés. Nous avons remarqué aussi des différences selon le type de ROS. Le H_2O_2 reste élevé jusqu'à 16 mmol/l glucose alors que le superoxyde diminue dramatiquement après 10 mmol/l glucose même en dessous des niveaux observés à une concentration basale du glucose. Quelques études ont suggéré que différents ROS exerçaient des effets distincts surtout sur l'apoptose des cellules (Li et al., 1997). Dans la plupart des cellules le superoxyde est converti en H_2O_2 , moins réactif, par la superoxyde dismutase, puis en eau par la catalase et la glutathion peroxydase, agissant ainsi comme mécanisme de défense contre le stress oxydatif. Fait intéressant, les cellules β contiennent de faibles niveaux d'enzymes antioxydantes en particulier la SOD par rapport à

d'autres tissus, ce qui suggère un possible rôle des ROS dans la sécrétion d'insuline. Cependant, seul le H_2O_2 a été proposé par plusieurs études comme étant un FCM pour le SIIG (Newsholme et al., 2009; Pi et al., 2007). Contrairement au superoxyde, le H_2O_2 est plus stable, non chargée, et c'est une molécule diffusible et rapidement synthétisée et dégradée, ce qui la classe parmi les molécules messagères potentielles. De plus, nombreuses études ont montré aussi qu'une augmentation des niveaux de glucose provoque une augmentation des ROS, en particulier le H_2O_2 , dans les îlots des rongeurs et dans des lignées cellulaires β (Pi et al., 2007; Rebelato et al., 2011). Toutes ces observations peuvent expliquer les différences entre le superoxyde et le H_2O_2 que nous avons observés.

Afin de mieux décortiquer la signalisation de différent métabolites et les candidats FCM pour le SIIG, nous avons utilisé une approche métabolomique ciblée dans les cellules INS 832/13. Des cellules INS 832/13 ont été choisies à la place des îlots isolés de rats en raison de la difficulté d'obtenir suffisamment de matériel à partir des îlots et parce que les îlots sont constitués de plusieurs types de cellules. En utilisant cette approche nous avons observé que certains métabolites tels que le fumarate, le malate, le citrate/isocitrate, le malonyl-CoA, le NADPH, le succinate et l'alanine suivent la même forme de saturation que la SIIG et peuvent être considéré comme des candidats FCM pour le SIIG ou tout au moins faire partie des voies menant à la production de FCM. Plusieurs études ont suggéré le rôle important de l'anaplérose/cataplérose et des cycles citrate/isocitrate/malate-pyruvate dans le SIIG (Jensen et al., 2008; Jitrapakdee et al., 2010; Nolan and Prentki, 2008; Prentki et al., 2013). La cataplérose du citrate génère du malonyl-CoA, un précurseur de la biosynthèse *de novo* et de l'élongation des FFA. Il contrôle également la vitesse d'oxydation des FFA à longues chaînes en inhibant la carnitine palmitoyltransférase I (CPT-I), l'étape limitante de cette voie (Roduit et al., 2004). Par conséquent, en inhibant l'oxydation des FFA, le malonyl-CoA pourrait jouer un rôle important dans le SIIG (Roduit et al., 2004) et être considéré comme FCM. Une baisse importante de HMG-CoA observée à des niveaux élevés de glucose est probablement due à la consommation de ce métabolite pour la synthèse du cholestérol, qui augmente avec la concentration de glucose dans les îlots. Le DHAP, le Gro3P, le pyruvate, le lactate, le citrate/isocitrate, l' α -KG et le NADH ne montrent aucune saturation même au-delà de 11mmol/l glucose et corrélaient mieux avec l'utilisation du glucose qu'avec la SIIG. Ces métabolites pourraient donc être impliqués dans des mécanismes de détoxification surtout s'ils sont exportés à l'extérieur de la cellule. Par

exemple, étant donné qu'une quantité importante de métabolites cataplérotiques y compris le citrate (Brun et al., 1996; Schuit et al., 1997) et l' α -kétooglutarate (Yang et al., 2008) sont exportés dans la plupart des cellules, ceci pourrait constituer un mécanisme important par lequel les carbones d'un nutriment en excès sont éliminés. En effet, dans nos études précédentes, nous avons pu observer que dans la cellule β jusqu'à 20% des carbones du glucose entrant via la glycolyse sortent sous-forme de citrate (Farfari et al., 2000). Ainsi, le citrate en vertu de sa participation dans la voie pyruvate/citrate et par sa capacité à sortir facilement de la cellule, peut être considéré un métabolite clé dans la cascade pour la SIIG qu'un métabolite impliqué dans la glucodétoxification. Le DHAP et le Gro3P augmentent aussi de manière linéaire avec les concentrations du glucose ce qui sous-entend une augmentation linéaire de la production et la libération du glycérol, probablement par l'hydrolyse directe du Gro3P par la G3PP, liée à la glucodétoxification, tout au moins en partie. Il a été démontré que dans les cellules β BRIN-BD11 le glucose est converti en lactate, glutamate et alanine (Brennan et al., 2003). Nos résultats montrent que le lactate augmente de façon linéaire avec le glucose dans les cellules INS832/13. L'augmentation du lactate peut ne pas être d'importance dans les îlots qui ont une quantité très faibles de lactate déshydrogénase et également du transporteur monocarboxylate (Ainscow et al., 2000; Zhao et al., 2001). Il est peu probable que ces derniers agissent comme FCM pour la SIIG ou impliqués dans le processus de détoxification, du moins dans la cellule β normale.

Différentes voies associées au cycle de Krebs génèrent des métabolites et des cofacteurs qui jouent un rôle dans l'amplification de la SIIG (Henquin et al., 2009; Jitrapakdee et al., 2010; Muoio and Newgard, 2008). La cellule β peut produire les différents intermédiaires du cycle de Krebs à partir du pyruvate via l'action de la pyruvate déshydrogénase pour produire de l'acétyl-CoA et la pyruvate carboxylase pour produire de l'oxaloacétate (Wollheim and Maechler, 2002) ou à travers différentes réactions anaplérotiques supplémentaires (Jensen et al., 2008). Bien que l'oxaloacétate n'a pas pu être mesuré en raison de son instabilité, nous avons observé une augmentation importante du malate en réponse au glucose, accompagnée d'une diminution de l'aspartate. Ceci est en accord avec le fait que la navette malate/aspartate joue un rôle important dans le transfert de NADH à travers la membrane mitochondriale et également dans la distribution anaplérotique de l'oxaloacétate dans les mitochondries, sous forme d'aspartate. Ces résultats confirment la proposition initiale de Simpson et al. (Simpson et al., 2006), au sujet de l'aspartate qui est consommé au cours de la SIIG et forme le premier substrat anaplérotique pour

le cycle de Krebs indépendamment de la pyruvate carboxylase. Une des composantes du cycle du pyruvate est la voie pyruvate/malate (MacDonald, 1995; Prentki et al., 2013) et plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'enzyme malique cytosolique réduisait la SIIG (Guay et al., 2007; Pongratz et al., 2007; Xu et al., 2008). Cependant, certaines études ont suggéré que ce cycle ne pouvait pas être aussi important pour la SIIG (Jensen et al., 2008), mais selon nos résultats et d'autres études (Guay et al., 2007; Pongratz et al., 2007; Xu et al., 2008), le malate pourrait être un FCM pour la sécrétion d'insuline; peut-être pas directement mais en étant un composant d'un des processus d'amplification. Il a été proposé que le glutamate mitochondriale est impliqué dans la SIIG, en partie suite à son accumulation rapide dans les granules d'insuline (Maechler and Wollheim, 2001), ainsi que via l'action de la glutamate déshydrogénase mitochondriale pour produire l' α -KG (Fahien et al., 1988), qui augmente avec les niveaux du glucose. Cependant, nos résultats n'indiquent aucun changement des niveaux du glutamate avec l'augmentation des concentrations du glucose. Toutefois, il est possible qu'il y ait une augmentation spécifique du glutamate dans les granules d'insuline sans changement des niveaux du glutamate total. De plus, le milieu utilisé dans nos expériences contient de la glutamine qui peut être rapidement transformé en glutamate maintenant les niveaux de ce dernier stables.

Le NADPH est un autre FCM candidat (Jensen et al., 2008; MacDonald et al., 2006; MacDonald et al., 2005; Reinbothe et al., 2009) qui corrèle relativement bien aussi avec la SIIG dans notre étude. La principale source du NADPH cytosolique est le métabolisme des métabolites cataplérotiques tels que l'isocitrate et le malate via l'action de l'isocitrate déshydrogénase et l'enzyme malique 1 (Prentki et al., 2013), respectivement. Le NADPH est un cofacteur pour les voies des chaperonnes, telles que la glutaredoxine et la thiorédoxine impliquées dans le repliement et l'exocytose de l'insuline (Ivarsson et al., 2005). De manière intéressante, tous les composants de ce système, y compris l'isocitrate, le malate, le GSH et le NADPH montrent des changements parallèles avec la SIIG, réitérant leur rôle dans le processus de sécrétion d'insuline et donc considérés comme des FCM pour la SIIG.

La régulation des canaux K_{ATP} par les nucléotides de type adénine dépend de l'effet inhibiteur de l'ATP sur le Kir6.2 et de l'effet activateur du MgADP sur le composant SUR1 du canal (Drews et al., 2010; Proks et al., 2010). Des études antérieures ont suggéré une diminution des niveaux d'ADP à des concentrations élevées de glucose (Fridlyand et al., 2005) et que l'ATP était

nécessaire pour les étapes d'amorçage de l'exocytose ainsi que pour le trafic intracellulaire des vésicules sécrétoires. Mais le rôle précis des variations de l'ATP intracellulaire dans la régulation directe du mécanisme d'exocytose est encore débattu. Il est intéressant de noter que dans la présente étude, au moment où on observe une augmentation modeste des niveaux d'ATP à des concentrations élevées de glucose, on remarque une importante diminution d'ADP, résultant en une augmentation du rapport ATP/ADP et facilitant ainsi la fermeture des canaux K_{ATP} , donc à l'exocytose. Ainsi, l'ADP (sa diminution) plus que l'ATP pourrait être un métabolite clé agissant comme FCM. Aucune relation directe n'a été observée entre la SIIG et d'autres nucléotides ainsi que l'AMPc. Cependant, certaines études suggèrent une corrélation entre les variations des niveaux d'ATP et des changements des concentrations d'AMPc dans les cellules β (Takahashi et al., 1999). De plus, il a été suggéré que la pulsatilité de la sécrétion d'insuline corrélait avec les oscillations des niveaux de Ca^{2+} et d'AMPc cytoplasmiques, qui sont tous deux directement contrôlés par le métabolisme du glucose (Dyachok et al., 2008). Donc selon ces études, l'AMPc serait un FCM pour la sécrétion d'insuline contrairement à ce que nous avons observé. Il est possible que l'AMPc soit un FCM dans une cellule β normale mais non pas dans une cellule β tumorale.

PGP chez les mammifères : son rôle central dans le contrôle du métabolisme et dans la gluco(lipo)détoxification

Découverte d'une activité G3PP chez les cellules de mammifères et identification de PGP à la base de cette activité

En utilisant la cellule β comme modèle, nous avons proposé que le cycle GL/FFA joue un rôle important dans la signalisation et permet également la gluco-détoxification en dirigeant les carbones du glucose vers le glycérol (Nolan et al., 2006b; Prentki and Madiraju, 2008). Ce glycérol est ensuite évacué par la cellule (MacDonald and Marshall, 2000; Noel et al., 1997) pour rejoindre la circulation où il sera éventuellement pris en charge par le foie. Nous avons proposé qu'un dysfonctionnement au niveau de cette voie d'élimination des carbones du glucose contribueraient à la pathogénèse du DT2 (Nolan et al., 2006b; Prentki and Madiraju, 2008; Reshef et al., 2003). Nous avons observé qu'à des concentrations élevées de glucose, les cellules INS832/13 et les îlots isolés de rat convertissent une partie importante du glucose en glycérol qui quitte la cellule via probablement les aquaporines. Les cellules β n'expriment pas ou très peu la

glycérokinase et donc le glycérol ne peut pas être significativement rephosphorylé et ainsi être retenu dans ces cellules (MacDonald and Marshall, 2000). Depuis longtemps, il était bien accepté que le glycérol provenait principalement de l'hydrolyse des glycérolipides (lipolyse). A notre surprise, nous avons observé, que dans la cellule β , la production et la libération du glycérol survenaient malgré l'inhibition des lipases par l'orlistat. Nous avons formulé l'hypothèse que les cellules β possédaient un autre mécanisme outre que la lipolyse des glycérolipides pour produire du glycérol. Une autre voie possible de production du glycérol serait l'hydrolyse directe du Gro3P par une phosphatase (voir figure 13). Nous avons donc supposé la présence d'une activité glycérol-3-phosphate phosphatase (G3PP) dans les cellules β . Toutefois, aucune enzyme possédant une activité G3PP n'avait été identifiée à ce jour dans des cellules de mammifères. Par contre chez les bactéries et levures, plusieurs enzymes avaient été caractérisées possédant des activités G3PP.

Une voie pour la production du glycérol alternative à la lipolyse avec le DHAP en tant que métabolite central a été bien décrite et documentée dans la levure, les plantes et les bactéries (Caparros-Martin et al., 2007; Fan et al., 2005; Norbeck et al., 1996; Skraly and Cameron, 1998). La voie du glycérol est composée principalement de deux enzymes: une glycérol-3-phosphate déshydrogénase catalysant la réduction du DHAP en Gro3P et une Gro3P phosphatase (Ditlecadet and Driedzic, 2013, 2014), convertissant le Gro3P en glycérol. Une analyse comparative de séquences de diverses G3PP connues de plusieurs organismes, nous a permis de mettre en évidence le site actif et les éléments structuraux importants pour l'activité G3PP (Figure 1C-article 2). Ces séquences clés ont été ensuite comparées aux séquences de plusieurs phosphatases connues de mammifères afin d'identifier une enzyme ayant un potentiel d'activité G3PP. Ces comparaisons nous ont conduit à l'identification d'une phosphatase décrite précédemment appelée phosphoglycolate phosphatase (PGP) (Rose, 1981), dont la fonction chez les mammifères est incertaine. Cette phosphatase appartient à la classe des haloacide déhalogénase (HAD) de type hydrolases (Kim et al., 2004; Rose, 1981) et il a été suggéré qu'elle était relativement spécifique au 2-phosphoglycolate avec une bonne efficacité catalytique (Teresa Pellicer et al., 2003).

Nous avons constaté que PGP était bien exprimée dans la cellule β et dans de nombreux d'autres tissus de rat et de souris, étant très abondant dans les testicules (Mugabo et al., 2016). La mesure *in vitro* de l'activité de PGP envers le Gro3P et d'autres composés de structure apparentée

suggèrent que le PGP fonctionne aussi comme G3PP. En effet, le PGP montre une bonne activité envers le Gro3P avec un K_m de 1,3 mmol/l. Il est important de noter que dans des conditions de haute teneur en glucose ou de disponibilité du glycérol, la concentration intracellulaire du Gro3P atteint des concentrations voisinant les mmol/l (Guay et al., 2013) dans des cellules de mammifères, et donc physiologiquement la PGP est capable d'agir sur le Gro3P et donc de contrôler sa disponibilité pour d'autres réactions telles que la synthèse des glycérolipides et la gluconéogenèse. Il est d'autant plus important de spécifier que l'activité de PGP n'affecte pas le bon fonctionnement de certaines enzymes qui utilisent le Gro3P comme substrat, telles que la GPAT1 et les GPDH mitochondriale et cytosolique, étant donné que leurs K_m sont beaucoup plus petits que celui de PGP pour le Gro3P (Beleznai et al., 1988; McLoughlin and MacQuarrie, 1978; Vancura and Haldar, 1994).

Si PGP est véritablement une G3PP chez les mammifères, ses niveaux devraient moduler la production du glycérol. En effet, des cellules INS832/13 ou des îlots de rats traités avec des niveaux élevés de glucose augmentent la production et la libération du glycérol, un effet complètement bloqué dans les mêmes cellules transfectées avec des siRNA ou infectées par un rétrovirus exprimant un shRNA afin de diminuer l'expression de PGP (Mugabo et al., 2016). Par contre, la libération du glycérol stimulée par le glucose est amplifiée par la surexpression de PGP dans ces mêmes cellules transfectées avec un vecteur d'expression ou infectées par un adénovirus exprimant PGP. Par conséquent, PGP semble hydrolyser directement le Gro3P, régulant ainsi la production et la libération du glycérol. En résumé, les résultats des expériences modifiant les niveaux d'expression de PGP démontrent que PGP a bel et bien une activité G3PP.

Expression de PGP dans les tissus et selon l'état nutritionnel

Nous avons par la suite examiné si l'état nutritionnel pouvait réguler l'expression de PGP *in vivo* (Mugabo et al., 2016). Chez la souris, une nuit de jeûne entraîne une augmentation significative de l'expression de PGP (l'ARNm et la protéine) dans le tissu adipeux viscéral comparé à l'état nourrit, alors que c'est le contraire dans le tissu adipeux brun (TAB) où on observe une diminution importante de l'expression de PGP.

Pendant le jeûne, les TG stockés dans le tissu adipeux sont hydrolysés par la lipase hormono-sensible du tissu adipeux pour produire des FFA (Vaughan, 1962) et du glycérol. Cette lipase est stimulée lors du jeûne par diverses hormones telles que les catécholamines (l'adrénaline notamment) et l'hormone corticotrope (ACTH) pour favoriser la libération dans le sang des FFA stockés dans les lipides des tissus adipeux. Plusieurs études ont noté une ré-estérification considérable des FFA dans le tissu adipeux pendant les périodes de lipolyse active (Vaughan, 1962). Cependant, les FFA sont primordiales dans la production d'énergie pendant les périodes de jeûne. Donc, ceci nous mène à suggérer qu'une augmentation des niveaux de la G3PP dans le TAV, pendant le jeûne, pourrait jouer un rôle important dans le métabolisme énergétique via l'étape limitante de la synthèse des TG du tissu adipeux catalysé par la GPAT en hydrolysant le Gro3P, et donc en augmentant la disponibilité des FFA pour la β -oxydation quand le glucose est bas car ils seraient moins estérifiés à nouveau si le Gro3P est diminué. Au niveau hépatique ceci serait important afin de produire des corps cétoniques nécessaires pour fournir de l'énergie consommée en grande partie par le cerveau en cas de jeûne prolongé (Freemantle et al., 2006). Dans le TAB, il est également probable que, à jeun, une diminution des niveaux de PGP joue un rôle clé dans la disponibilité du Gro3P nécessaire pour assurer la synthèse des TG à partir des FFA lipolytiques. Cela signifierait une augmentation du taux de ré-estérification des FFA et une diminution de la disponibilité des FFA pour les mitochondries afin d'y être oxydés, afin de réduire la dépense énergétique et la thermogénèse pendant le jeûne.

Nous avons également examiné si un régime riche en graisse (HFD) avait un effet sur l'expression de PGP *in vivo*. L'effet de la HFD sur la régulation de PGP est prononcé dans plusieurs tissus. Des souris nourries avec une HFD (60% d'énergie provenant du gras) pendant 8 semaines montrent une augmentation des niveaux de l'ARNm de PGP dans le cœur, le TAB et les testicules et une diminution au niveau du muscle squelettique, l'intestin et du TAV comparé à des souris nourries avec un régime normal (ND). Cependant, nous avons observé une augmentation significative de la teneur en protéines de PGP seulement dans le cœur et une diminution dans le foie et le TAV.

Il est à noter que les FFA représentent la principale source d'énergie pour le cœur adulte dans des conditions physiologiques normales. Il a été démontré que dans des modèles animaux obèses et diabétiques, l'accumulation des TG au niveau du myocarde était associée à une diminution de la fonction myocardique (Christoffersen et al., 2003; Zhou et al., 2000). La

synthèse des TG au niveau du myocarde nécessite des FFA et obligatoirement le Gro3P. De manière intéressante, nos données montrent que le PGP au niveau du cœur augmente de manière significative chez les souris HFD par rapport à des souris ND, ce qui suggère que la G3PP pourrait jouer un rôle important dans la prévention d'une éventuelle lipotoxicité du myocarde en hydrolysant directement le Gro3P.

Une accumulation hépatique des TG (stéatose hépatique) est associée à l'obésité, l'insulinorésistance, le DT2 et les maladies cardiovasculaires (Reusch, 2002; Younossi et al., 2002). Nous avons constaté que la PGP hépatique est significativement diminuée chez la souris nourrie avec une HFD par rapport à des souris contrôles et cela pourrait expliquer, du moins en partie, pourquoi le foie accumule facilement le gras sous forme de TG en présence de HFD.

Cependant, PGP semble jouer un rôle protecteur dans le TAV. Le rôle principal du TAV est de stocker du gras sous forme de TG lorsque la dépense d'énergie est inférieure à l'apport en énergie (Vazquez-Vela et al., 2008). Une dysfonction du TAV contribue à une utilisation anormale et l'entreposage sous forme de TG des FFA dans plusieurs tissus tels que le foie, le pancréas et le cœur pour en citer certains causant ainsi de multiples anomalies métaboliques comme la lipotoxicité (Vazquez-Vela et al., 2008). Chez les souris HFD, on remarque une baisse importante de l'expression de PGP (mRNA et protéine) dans le TAV comparé aux souris ND ce qui devrait favoriser le stockage du gras dans le TAV et par conséquent prévenir une accumulation de gras et une éventuelle lipotoxicité dans les tissus non adipeux.

Rôle(s) de PGP dans les cellules β

La synthèse des glycérolipides est augmentée dans les cellules β qui expriment peu PGP et elle diminue dans celles où son expression est augmentée. Considérant que certains de ces lipides jouent un rôle de signalisation dans différents types de cellules, l'activité G3PP serait susceptible de réguler ces voies de signalisation liées à la production de FCM, tel le DAG et le MAG.

L'oxydation des FFA reste inchangée suite à des modifications induites par l'activité de PGP tandis que leur libération, dépendante principalement de la lipolyse, est élevée à haut glucose quand l'expression de PGP est augmentée. Ceci suggère qu'à des niveaux élevés de glucose, un manque de quantité suffisante de Gro3P suite à son hydrolyse par PGP, empêche les FFA de se ré-estérifier, menant ainsi à une augmentation de leur production et leur libération, ce

qui pourrait contribuer à diminuer un stress métabolique. En accord avec ces données, nous avons observé qu'une baisse de l'expression de PGP dans les cellules INS832/13 accentuait la glucolipotoxicité en présence des niveaux élevés de glucose et de FFA tandis que la surexpression de PGP montrait un effet protecteur (Mugabo et al., 2016).

Le Gro3P joue aussi un rôle important dans le transfert d'électrons vers la mitochondrie via la GPDH mitochondriale, par conséquent des variations dans la disponibilité du Gro3P peuvent réguler la respiration mitochondriale (Mracek et al., 2013). En effet, une diminution des niveaux de PGP dans la cellule β mène à une augmentation à la fois de la production d'ATP et de la consommation d'O₂ alors que des niveaux élevés de PGP causent des effets opposés. Cette augmentation de la consommation d'O₂ remarquée chez les cellules avec des niveaux moindres de PGP peut aussi expliquer l'effet toxique dans ce groupe car cette augmentation est souvent associée à une formation de ROS et des dommages oxydatifs qui s'en suivent.

De manière intéressante, nous avons remarqué un lien entre les effets de PGP sur la SIIG et les effets sur les métabolismes du glucose et lipidique. Des niveaux élevés de glucose se traduisent par une augmentation des niveaux de tous les intermédiaires lipidiques du cycle GL/FFA, y compris les DAG, les phospholipides et les FFA (Nolan et al., 2006b). Par conséquent, la capacité des cellules β sous-exprimant PGP d'augmenter la SIIG et celle des cellules β surexprimant PGP de diminuer la SIIG appuient fortement l'idée que PGP est l'une des enzymes limitantes du cycle GL/FFA et que ce cycle joue un rôle clé dans la génération des FCM pour la SIIG. De plus, le changement dans la production d'ATP dans ces cellules corrèle bien avec la SIIG et ceci supporte l'hypothèse comme quoi, dans la cellule β , la sécrétion d'insuline est induite par une augmentation du ratio ATP/ADP (Matschinsky, 1996). Ainsi, la modulation de l'expression de PGP dans les cellules β a un impact significatif sur le métabolisme du glucose et des lipides, la SIIG et la glucolipotoxicité. Ceci démontre que PGP joue un rôle important dans la cellule β en contrôlant le métabolisme énergétique, la sécrétion d'insuline ainsi que la réponse à un stress métabolique.

Rôle(s) de PGP dans les hépatocytes

En raison du rôle important du Gro3P comme intermédiaire métabolique central au carrefour du métabolisme du glucose et des lipides, nous avons examiné si PGP joue un rôle

crucial dans la régulation du métabolisme hépatique. Le foie est le site majeur de la gluconéogenèse, dont les substrats peuvent être soit des acides aminés, du pyruvate/lactate ou du glycérol provenant de la lipolyse du tissu adipeux et ces voies impliquent la formation du DHAP lié au Gro3P via la GPDH cytosolique (Figure 2H, article 2). Une sous-expression de PGP dans des hépatocytes isolés de rat incubés 2h en présence du glycérol et du pyruvate/lactate, résulte à une augmentation de la production du glucose. Inversement, la surexpression de PGP abolit complètement la production du glucose à partir du glycérol et du pyruvate/lactate. Ceci révèle que la G3PP/PGP contrôle la néoglucogenèse.

Nous avons aussi étudié la relation entre les niveaux d'expression de PGP et le métabolisme des lipides dans le foie. L'oxydation des FFA dans le foie dépend de la disponibilité d'acides gras sous forme d'acyl-CoA et de l'activité de GPAT1 (Wendel et al., 2013). En accord avec des observations par le groupe de Coleman (Nagle et al., 2007) où GPAT1 a été surexprimée, nos données montrent qu'une diminution de l'expression de PGP dans des hépatocytes isolés, redirige les FFA de la β -oxydation vers la synthèse des phospholipides, DAG et TG, tandis qu'une augmentation des niveaux de PGP fait le contraire en diminuant la lipogenèse et augmentant l'oxydation des FFA. Ces résultats, sur l'oxydation des FFA, sont différents de ceux des cellules INS832/13 où la β -oxydation était inchangée (Mugabo et al., 2016) probablement dû à la nature lipogénique du foie.

De manière intéressante, la formation des esters du cholestérol était diminuée par la surexpression hépatique de PGP et ceci est probablement dû à une diminution d'acides gras sous forme d'acyl-CoA causée par leur oxydation dans les mitochondries (Chang et al., 2006). Cette baisse des niveaux du CE au niveau hépatique suggère que des niveaux de PGP peuvent réguler l'homéostasie du cholestérol.

Par la suite on a évalué l'effet des niveaux d'expression de PGP sur le contrôle du métabolisme hépatique du glucose. À des concentrations élevées de glucose, la production et la libération du glycérol par les hépatocytes était réduite par la diminution de PGP et était augmentée par sa surexpression. De plus, la production et la libération du lactate hépatique (un index du flux glycolytique) étaient augmentées quand la PGP hépatique était réduite alors qu'on observe une diminution complète de ce flux glycolytique quand les hépatocytes surexpriment la

G3PP. Ces données suggèrent que la G3PP contrôle la glycolyse en modulant la destination des carbones du glucose sous forme de glycérol. En utilisant une approche de métabolomique ciblée, on a remarqué une nette augmentation du Gro3P après un « knock-down » de la G3PP chez les hépatocytes isolés de rats tandis qu'une surexpression de cette dernière diminue les niveaux du Gro3P et du DHAP à 25 mmol/l de glucose. En résumé, la surexpression de la G3PP transfère les carbones du glucose vers la formation du glycérol, ce qui conduit à une diminution du DHAP et aussi du NADH utilisée par la GPDH cytosolique pour la conversion du DHAP en Gro3P. Cette consommation de NADH par la GPDH cytosolique va entraîner une réduction de la formation d'ATP mais aussi la réduction de la production de lactate dans les hépatocytes. Ces mécanismes prennent la direction opposée suite à un « knock-down » de PGP hépatique. De plus, les résultats nous laissent supposer que PGP régule l'état redox des hépatocytes car le rapport lactate/pyruvate change avec les niveaux de la G3PP. Il est aussi important de noter que les niveaux du 2-phosphoglycolate (2-PG), le premier substrat décrit pour la PGP, étaient très bas chez les hépatocytes et les modifications des niveaux d'expression de PGP n'affectaient pas de manière significative les niveaux de 2-PG. Nos résultats nous indiquent que les concentrations intracellulaires du Gro3P sont favorables pour la PGP car ils se situent autour de 4,5 mmol/l à des concentrations élevées de glucose. En effet, le K_m de PGP pour le Gro3P se situe aux alentours de 1.3 mmol/l. Par conséquent, le 2-PG ne semble pas être le substrat physiologique pour cette enzyme tout au moins dans l'hépatocyte et la fonction physiologique principale de cette enzyme est très probablement d'hydrolyser le Gro3P du moins dans les hépatocytes ou la cellule β . Une fonction nouvelle de PGP non exclusive de l'activité G3PP liée à la détoxification vient d'être suggérée pour cet enzyme par le groupe de Van Schaftingen (Collard et al., 2016). En effet, ils ont démontré que PGP, chez les cellules des mammifères, pouvait hydrolyser le 4-phosphoerythronate et le 2-phospho-lactate produits suite aux actions des enzymes glycolytiques GAPDH et pyruvate kinase respectivement. Ces deux métabolites s'avèrent potentiellement toxiques une fois accumulés dans les cellules, suggérant qu'une déficience dans des enzymes de réparations/détoxification telle que PGP peut mener à des désordres métaboliques. Ces résultats fort intéressants ne sont pas en contradiction avec les notre mais complémentaires et ne questionnent pas que la fonction principale de PGP est comme nous le pensons l'hydrolyse du Gro3P, tout au moins quantitativement. En effet les niveaux de ces autres métabolites toxiques hydrolysés par la PGP sont présents à des concentrations extrêmement faibles dans les cellules.

Effet de la surexpression de PGP hépatique *in vivo* chez le rat

Une preuve additionnelle que PGP est une enzyme clé qui hydrolyse le Gro3P et régule le métabolisme énergétique, a été obtenue en modifiant les niveaux d'expression de PGP hépatique *in vivo*. La surexpression *in vivo* de la G3PP chez des jeunes rats résulte à une perte de 10% du poids corporel accompagnée d'une modeste réduction de la prise alimentaire. Une semaine après l'injection du virus chez ces rats afin de surexprimer la G3PP dans le foie, les niveaux de glycérol plasmatique étaient augmentés de 2 fois comparées aux rats contrôles, suggérant qu'une augmentation des niveaux de PGP hépatique est capable de générer du glycérol *in vivo* qui est ensuite libéré dans la circulation. De même, les niveaux de TG plasmatiques sont eux aussi affectés par la surexpression de la PGP dans le foie. On observe une baisse des TG plasmatiques probablement causée par une diminution de la synthèse des TG hépatiques. Fait intéressant, ces mêmes rats présentaient une plus faible glycémie suite à un test de tolérance au glycérol comparé aux souris témoins, suggérant une réduction de la gluconéogenèse hépatique. Donc, ces résultats impliquent la PGP dans la régulation de la gluconéogenèse hépatique.

Récemment, il a été proposé que la metformine, un agent antidiabétique bien connu et très utilisé, régule la gluconéogenèse hépatique en inhibant la GPDH mitochondriale (Madiraju et al., 2014). Dans notre étude, nos résultats suggèrent qu'une réduction des niveaux du Gro3P, suite à une augmentation de l'activité de PGP, mènerait aussi à une diminution de l'activité de la GPDH mitochondriale car il y aurait moins de substrat pour cette enzyme. Donc, la metformine et PGP inhiberaient la gluconéogenèse hépatique via deux mécanismes différents : la metformine par l'inhibition directe de la GPDH mitochondriale et par conséquent via l'augmentation de l'état redox cytosolique, et PGP par la diminution du Gro3P et du DHAP, deux substrats inconditionnels de la gluconéogenèse hépatique.

Des analyses sanguines chez les rats surexprimant PGP révèle une augmentation des niveaux de HDL plasmatiques alors que les LDL plasmatiques ont une tendance à baisser. Dans leur ensemble, ces données et celles des hépatocytes isolés de rats (*in vitro*), suggèrent que la PGP joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides au niveau hépatique.

4. CONCLUSION

Les résultats présentés dans cette thèse contribuent à notre connaissance, dans les cellules β du pancréas, des voies métaboliques et FCM impliqués pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et pour la détoxification du glucose en excès. De plus, on a pu identifier une nouvelle enzyme métabolique présente chez les cellules des mammifères capable de transformer directement le Gro3P en glycérol et réguler le métabolisme énergétique.

Dans notre première étude, les résultats appuient l'existence dans les cellules pancréatiques β , de voies métaboliques pouvant jouer un rôle dans la détoxification des nutriments en excès. Ces processus de détoxification pourraient impliquer la formation des formes de stockages d'énergie relativement « inertes » tels que les triglycérides, le glycogène et les esters de cholestérol et la libération extracellulaire de métabolites dérivés du glucose comme le glycérol, le cholestérol et les FFA. En outre, les données indiquent que des destinations importantes des métabolites du glucose sont les molécules lipidiques et le glycérol.

L'utilisation d'une méthode de métabolomique ciblée nous a permis de mesurer une dose réponse aux concentrations croissantes du glucose d'une large gamme de métabolites dans les cellules INS 832/13. Jusqu'à présent, la quasi-totalité des études visant à définir les FCM pour le SIIG a utilisé des milieux pauvres en énergie dans les conditions de bases contrairement à ce qui a été utilisé dans cette étude. Nos résultats montrent que l'oxydation du glucose, la consommation d'oxygène, la production d'ATP, quelques intermédiaires du cycle de Krebs, le malonyl-CoA et une baisse des niveaux d'ADP corrélaient bien avec la sécrétion d'insuline ce qui renforce l'hypothèse proposant ces voies et FCM comme important pour la SIIG. D'autres tels que l'ATP, l'AMPc, les ROS et le glutamate, considérés aussi comme des FCM pour le SIIG, ne montrent peu ou pas de corrélation avec la sécrétion d'insuline. Ceci n'exclut pas leur rôle comme FCM car on ne peut exclure que des concentrations locales de ces métabolites jouent un rôle important ou qu'ils seraient importants dans une cellule β normale et non tumorale. L'utilisation du glucose augmente de façon linéaire avec les concentrations du glucose et corréla bien avec la libération du glycérol, le contenu en glycogène, la synthèse et la libération des FFA ainsi que le contenu en TG et en cholestérol et ses esters. En résumé, ces données mettent en lumière le rôle de différents mécanismes dans la signalisation métabolique des cellules β , tels que le métabolisme oxydatif mitochondrial, l'anaplerose et la voie malonyl-CoA/lipides et suggèrent qu'une diminution des niveaux d'ADP pourrait jouer un rôle important dans la sécrétion d'insuline.

Deuxièmement, nous avons identifié une enzyme métabolique dans des cellules de mammifères qui peut directement transformer le Gro3P en glycérol. L'identification d'une activité glycérol-3-phosphate phosphatase (G3PP) auparavant inconnue dans les cellules de mammifères est une contribution scientifique importante à la connaissance du métabolisme intermédiaire et à la signalisation métabolique au sens large. Nous avons démontré que PGP, dont la fonction est mal connue chez les mammifères, agit en fait comme une G3PP. En utilisant les techniques de génétiques moléculaires, nous avons trouvé que la PGP, en contrôlant les niveaux du Gro3P, régule la glycolyse, la gluconéogenèse, la synthèse des glycérolipides et l'oxydation des FFA dans la cellule β pancréatique et les hépatocytes. Elle régule aussi le SIIG ainsi que la glucolipotoxicité dans la cellule β pancréatique. La surexpression *in vivo* de la PGP/G3PP dans le foie des rats diminue le gain de poids corporel et la production hépatique du glucose à partir du glycérol et augmente les niveaux de HDL plasmatiques. La G3PP est bien exprimée dans la majorité des tissus et son expression varie en fonction de l'état nutritionnel dans certains de ces tissus. Puisque le Gro3P se situe au carrefour du métabolisme glucidique, lipidique et énergétique, le contrôle de sa disponibilité par la G3PP est un ajout important à notre compréhension de la régulation métabolique. Ainsi, la G3PP est une cible potentielle pour le DT2 et les troubles cardiométaboliques tels que l'obésité.

5. PERSPECTIVES

Les observations documentées dans cette thèse mettent en lumière la G3PP comme régulateur important du métabolisme du glucose, des lipides et énergétique via son activité phosphatase sur le Gro3P. Cette activité liée au gène PGP était jusqu'à aujourd'hui inconnue chez les mammifères et son rôle ainsi que sa régulation sont en grande partie inexplorés à ce jour. Il reste donc plusieurs années de travaux pour mettre en lumière l'importance de cette enzyme dans la régulation du métabolisme, la physiologie humaine et son potentiel comme cible thérapeutique. Des avenues initiales possibles de recherche sont indiquées ci-dessous.

1. Rôle de G3PP dans la régulation du métabolisme énergétique et la sécrétion d'insuline *in vivo*

Afin de confirmer les résultats obtenus avec des lignées cellulaires, les cellules β normales et les hépatocytes isolés et de mieux connaître les rôles de la G3PP *in vivo*, il sera nécessaire d'utiliser

un modèle de souris ayant un KO global de PGP/G3PP. L'étude avec ces souris va nous permettre aussi via l'utilisation du modèle nutritionnel DIO, d'étudier l'importance de cette enzyme dans le développement de l'obésité et des manifestations qui lui sont associées comme la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie et l'intolérance au glucose. Nous pourrions aussi utiliser des souris PGP/G3PP avec un KO spécifique aux cellules pancréatique β car nous avons déjà établi au niveau des lignées cellulaires β pancréatiques INS832/13 l'importance de PGP/G3PP dans la régulation de la sécrétion d'insuline et du métabolisme lipidique et il serait important de le confirmer *in vivo*. Ces études permettront de déterminer quelle est l'importance du G3PP dans la régulation des voies métaboliques entre autres dans des conditions d'excès de nutriments et dépendamment des résultats d'envisager d'utiliser cette enzyme comme une cible thérapeutique pour la lutte contre l'obésité et le DT2.

2. Interaction réciproque entre la G3PP et l'AMPK dans le contrôle du métabolisme hépatique et de la cellule β .

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase que l'on retrouve exprimée dans un grand nombre de tissus. C'est une protéine hétérotrimérique constituée d'une sous-unité catalytique (α) et de deux sous-unités régulatrices (β et γ) (Kahn et al., 2005). L'activation de l'AMPK régule plusieurs voies métaboliques et l'état de son activation dépend de la concentration intracellulaire en AMP (Figure 15). Il a été récemment suggéré qu'une stimulation du cycle GL/FFA, qui augmente les niveaux d'AMP et par conséquent l'activation d'AMPK (Gauthier et al., 2008; Prentki and Madiraju, 2012), pouvait réduire le stockage d'énergie et favoriser la détoxification des nutriments en excès (Steinberg et al., 2006). Bref, l'AMPK constitue un détecteur de l'état énergétique de la cellule et joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique.

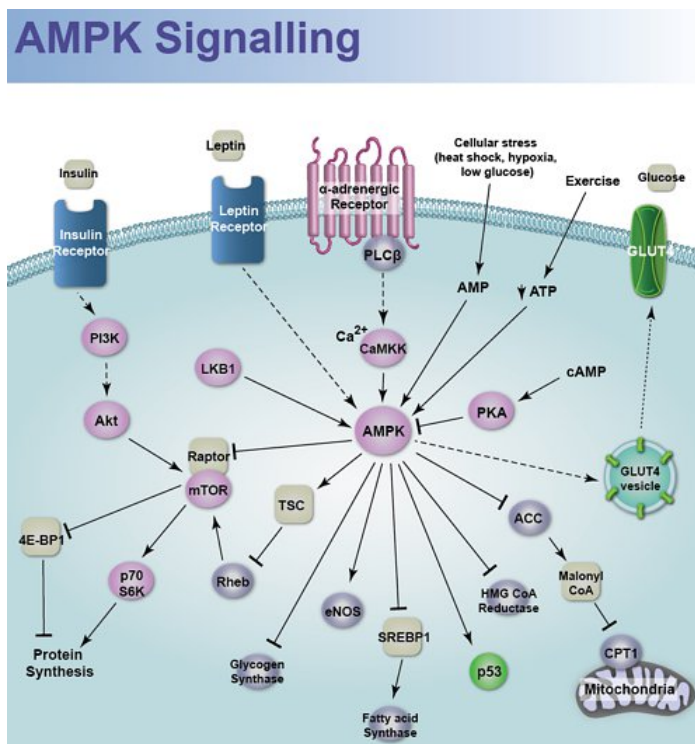


Figure 15. Voies d'activation et de signalisation de l'AMPK. Tocris Bioscience, 2016

Comme la G3PP et l'AMPK sont liées à la réponse au stress métabolique, la détoxification des nutriments en excès et régulent le métabolisme dans son ensemble, il serait donc intéressant d'évaluer s'il existe une interaction entre G3PP et AMPK, soit protéine-protéine ou au niveau de leurs voies métaboliques respectives, et si cette interaction régule le métabolisme hépatique et de la cellule β . A la lumière de résultats préliminaires (non présentés), nous pensons qu'il existe une régulation réciproque entre G3PP et AMPK, et que ce processus régule le métabolisme énergétique. En effet, ces résultats indiquent que l'AMPK et la G3PP ont une régulation réciproque, l'AMPK causant une augmentation de l'expression de G3PP et de son activité, alors que la G3PP agit comme une rétro-inhibition pour diminuer l'activité de l'AMPK. Afin de répondre à cette question, nous pourrions étudier comment l'interaction G3PP/AMPK régule le métabolisme et comment la G3PP régule l'AMPK, et l'AMPK régule la G3PP aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Pour ce faire, en utilisant des hépatocytes primaires et/ou des îlots isolés de rat, nous allons utiliser des approches de biologie moléculaires et pharmacologiques pour moduler l'expression de G3PP et l'activité d'AMPK, respectivement. Dans un premier temps, des siRNA et des adénovirus seront utilisés pour diminuer et augmenter

les niveaux d'expression de G3PP, respectivement, et les impacts de ces changements d'expression sur la modulation de l'activité de l'AMPK seront mesurés. Dans un deuxième temps, à l'opposé nous pensons diminuer et augmenter les niveaux d'expression d'AMPK et évaluer l'effet sur l'expression et l'activité de la G3PP. De plus, il serait intéressant d'utiliser des agents pharmacologiques afin de moduler l'activité d'AMPK tel que l'AICAR, la metformine et le composé C, et mesurer l'expression et l'activité de G3PP. Nous anticipons des changements d'expression de G3PP suite à une augmentation de l'activité de l'AMPK. Au final, si les résultats montrent une interaction entre AMPK et G3PP, nous poursuivrons en étudiant comment la G3PP régule l'AMPK et/ou l'AMPK régule la G3PP aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. De plus, nous allons évaluer l'impact de ces changements sur le métabolisme intermédiaire en mesurant différentes voies métaboliques telles que l'oxydation du glucose et des acides gras, le métabolisme mitochondriale, la gluconéogenèse et la lipolyse. Une des limitations de cette approche est qu'il sera difficile de savoir si l'interaction entre ces deux enzymes est directe ou indirecte. En effet, s'il s'avère que AICAR augmente et/ou active G3PP il sera difficile de déterminer si l'action est directement via l'AMPK ou un autre effecteur impliqué dans la signalisation d'AMPK. Les études de phosphorylation de G3PP mentionnées ci-dessous pourraient en partie remédier à cette limite.

3. Régulation post-traductionnelle et hormonale de G3PP chez les cellules des mammifères

La G3PP pourrait jouer un rôle particulièrement important dans la régulation du métabolisme et de protection contre le stress métabolique quand son expression est augmentée. Par conséquent, il est intéressant d'identifier la façon dont elle est régulée et activée. Plusieurs types de modifications post traductionnelles sont possibles telles que la phosphorylation, la malonylation, l'acétylation, la succinylation et la summoylation, mais la phosphorylation est la plus étudiée et la plus souvent impliquée dans la régulation de l'activité d'enzymes. En utilisant un logiciel de détection de sites de phosphorylation spécifiques aux kinases, nous avons constaté que PGP/G3PP possède des sites de phosphorylation spécifiques aux sérine/thréonine kinases. Donc, nous pensons que G3PP peut être phosphorylée par certaines protéines kinases et que ce processus peut augmenter son activité. En premier lieu, il sera intéressant d'évaluer si la G3PP est phosphorylée soit sur certains de ses résidus sérine/thréonine ou des tyrosines.

Deuxièmement, si la réponse est positive on devra évaluer si le(s) site(s) de phosphorylation est nécessaire pour l'activité G3PP. Pour ce faire, et s'il s'avère que l'AMPK active la G3PP (*étude 2*), on pourra traiter les cellules hépatiques par un activateur d'AMPK (AICAR) et par la suite procéder à une immunoprécipitation de PGP/G3PP et mesurer la phosphorylation des sites sérine/thréonine et/ou tyrosine. Si l'AMPK n'est pas impliquée, on pourra utiliser des activateurs d'autres kinases impliquées dans le métabolisme énergétique, tels que l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), un activateur de la protéine kinase A. Si nous obtenons les résultats escomptés, la suite logique sera d'introduire une mutation (technique de mutagenèse dirigée) au niveau du résidu phosphorylé et refaire le même traitement et ensuite évaluer l'activité de la G3PP. Afin de prouver la fonctionnalité de certains sites possibles de phosphorylation, nous anticipons que si en présence de AICAR et/ou IBMX la phosphorylation sur les résidus sérine/thréonine augmente l'activité de G3PP, en faisant une mutation inactivante au niveau de ces résidus on devrait perdre cet effet. Nous tenterons de déterminer aussi si l'expression et la phosphorylation de G3PP est modulée par diverses hormones telles l'insuline, le glucagon, les glucocorticoides, les hormones thyroïdiennes, toutes susceptibles d'influencer grandement le métabolisme et donc une enzyme telle la G3PP. Ces études seront effectuées initialement *in vivo* chez la souris ou le rat puis *in vitro* en utilisant des hépatocytes isolés.

4. Identification et sélection de petites molécules activatrices de G3PP

Un modulateur positif de G3PP pourrait avoir des effets bénéfiques pour le DT2, l'obésité et le cancer en déviant les carbones du glucose de la glycolyse vers le glycérol. Dans les cellules pancréatiques β , un tel activateur pourrait préserver la masse et la fonction de ces cellules dans le contexte du stress métabolique causé par l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie. Il pourrait aussi limiter la sécrétion excessive d'insuline qui peut contribuer à une augmentation de l'obésité et la résistance à l'insuline. Ces modulateurs que notre laboratoire cherche à développer en collaboration avec des pharmas/biotechs pourraient également réduire la production hépatique de glucose excessive, très présente chez les diabétiques, protéger divers tissus du stress métabolique associé à un excès de nutriments qui cause par exemple les complications du diabète, et inhiber également la prolifération des cellules cancéreuses qui dépendent de la glycolyse. Un membre du laboratoire a d'ailleurs généré des résultats préliminaires montrant effectivement que la

surexpression de la G3PP ralenti la prolifération des cellules cancéreuses en utilisant une lignée pancréatique. L'identification de modulateurs de G3PP pourrait avoir donc un impact thérapeutique important pour les maladies dites cardiométaboliques et aussi le cancer.

Afin d'identifier et sélectionner de petites molécules activatrices de G3PP nous devons développer avec le secteur industriel une mesure rapide fluorescente *in vitro* de l'enzyme permettant de cribler des centaines de milliers de molécules de diverses bibliothèques. Nous sélectionnerons des composés qui augmentent spécifiquement la V_{max} sans pour autant affecter le K_m pour le Gro3P. Les effets et l'utilité des activateurs de G3PP ainsi identifiés seront validés sur la SIIG et contre la glucolipotoxicité dans des îlots de rats et humains et sur la gluconéogenèse dans des hépatocytes primaires de rats et humains. Ces composés seront également testés pour leurs effets sur la prolifération et l'apoptose des diverses cellules cancéreuses. Deuxièmement, on devra ensuite procéder à l'évaluation de l'efficacité des meilleurs activateurs de G3PP *in vitro* dans le contexte *in vivo*. Pour une éventuelle efficacité contre l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète, les composés seront testés dans un modèle de souris soumis à un régime alimentaire HFD/DIO (60% des calories provenant des lipides). Les composés seront administrés pendant 12 semaines et des tests de tolérance au glucose et de l'insuline vont être faits à ce moment-là. Le gain de poids corporel et la consommation alimentaire seront contrôlés. La dépense énergétique et l'activité physique seront mesurées que si l'apport alimentaire et/ou le poids corporel sont modifiés. Un test de surcharge de glycérol sera fait pour évaluer la production hépatique du glucose. D'autres études sur l'effet de ces molécules sur les complications du diabète et le cancer dans le contexte *in vivo* pourront être envisagées. Une limite est qu'il est beaucoup plus difficile de développer des activateurs que des inhibiteurs pharmacologiques d'enzymes. Néanmoins, nous avons testé quelques molécules potentiellement activatrice de l'enzyme et nous en avons trouvé deux, ce qui est encourageant.

Compte tenu des effets bénéfiques de la surexpression de G3PP sur les métabolismes du glucose, des lipides et énergétique, la recherche d'activateurs puissants et spécifiques pour cette enzyme pourrait aboutir au développement d'une toute nouvelle classe de médicaments contre le DT2 l'obésité et les maladies cardiovasculaires ou même le cancer. À l'heure actuelle, notre laboratoire est en train de procéder aux étapes initiales du criblage de composés/activateurs de G3PP avec pour objectif de développer des médicaments anti-diabétiques.

6. REFERENCES

- Abbasi, F., McLaughlin, T., Lamendola, C., and Reaven, G.M. (2000). Insulin regulation of plasma free fatty acid concentrations is abnormal in healthy subjects with muscle insulin resistance. *Metabolism: clinical and experimental* 49, 151-154.
- Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., and Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729-733.
- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., and Wakil, S.J. (2005). Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12011-12016.
- Abu-Shanab, A., and Quigley, E.M. (2010). The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 691-701.
- Abumrad, N., Harmon, C., and Ibrahimi, A. (1998). Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res* 39, 2309-2318.
- Adams, J.M., 2nd, Pratipanawatr, T., Berria, R., Wang, E., DeFronzo, R.A., Sullards, M.C., and Mandarino, L.J. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53, 25-31.
- Adiels, M., Taskinen, M.R., Packard, C., Caslake, M.J., Soro-Paavonen, A., Westerbacka, J., Vehkavaara, S., Hakkinen, A., Olofsson, S.O., Yki-Jarvinen, H., et al. (2006). Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 49, 755-765.
- Agarwal, A.K., Barnes, R.I., and Garg, A. (2006). Functional characterization of human 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase isoform 8: cloning, tissue distribution, gene structure, and enzymatic activity. *Archives of biochemistry and biophysics* 449, 64-76.
- Agius, L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414, 1-18.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P.t., Boyd, A.E., 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D.A. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423-426.
- Ahren, B. (2005). [New strategy in type 2 diabetes tested in clinical trials. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) affects basic caused of the disease]. *Lakartidningen* 102, 545-549.
- Ainscow, E.K., Zhao, C., and Rutter, G.A. (2000). Acute overexpression of lactate dehydrogenase-A perturbs beta-cell mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Diabetes* 49, 1149-1155.
- Alberti, K.G., and Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 15, 539-553.

- Allen, K.N., and Dunaway-Mariano, D. (2004). Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trends Biochem Sci* 29, 495-503.
- Allen, K.N., and Dunaway-Mariano, D. (2009). Markers of fitness in a successful enzyme superfamily. *Curr Opin Struct Biol* 19, 658-665.
- American Diabetes, A. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 33 *Suppl 1*, S62-69.
- Armoni, M., Harel, C., Bar-Yoseph, F., Milo, S., and Karnieli, E. (2005). Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. *The Journal of biological chemistry* 280, 34786-34795.
- Ashcroft, F.M. (1991). Ca²⁺ channels and excitation-contraction coupling. *Curr Opin Cell Biol* 3, 671-675.
- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E., and Ashcroft, S.J. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312, 446-448.
- Baker, N., and Schotz, M.C. (1967). Quantitative aspects of free fatty acid metabolism in the fasted rat. *J Lipid Res* 8, 646-660.
- Balkau, B., and Charles, M.A. (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 16, 442-443.
- Ball, L.E., Berkaw, M.N., and Buse, M.G. (2006). Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 313-323.
- Ballard, F.J., Hanson, R.W., and Leveille, G.A. (1967). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J Biol Chem* 242, 2746-2750.
- Baron, A.D., Zhu, J.S., Zhu, J.H., Weldon, H., Maianu, L., and Garvey, W.T. (1995). Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *The Journal of clinical investigation* 96, 2792-2801.
- Bastie, C.C., Hajri, T., Drover, V.A., Grimaldi, P.A., and Abumrad, N.A. (2004). CD36 in myocytes channels fatty acids to a lipase-accessible triglyceride pool that is related to cell lipid and insulin responsiveness. *Diabetes* 53, 2209-2216.
- Becker, K.P., and Hannun, Y.A. (2005). Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1448-1461.
- Beleznai, Z., Szalay, L., and Jancsik, V. (1988). Ca²⁺ and Mg²⁺ as modulators of mitochondrial L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *European journal of biochemistry / FEBS* 170, 631-636.

- Ben-Amotz, A., and Avron, M. (1973). The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol* 51, 875-878.
- Bender, K., Newsholme, P., Brennan, L., and Maechler, P. (2006). The importance of redox shuttles to pancreatic beta-cell energy metabolism and function. *Biochem Soc Trans* 34, 811-814.
- Bensellam, M., Laybutt, D.R., and Jonas, J.C. (2012). The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Molecular and cellular endocrinology* 364, 1-27.
- Bertrand, G., Ishiyama, N., Nenquin, M., Ravier, M.A., and Henquin, J.C. (2002). The elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. *J Biol Chem* 277, 32883-32891.
- Biden, T.J., Prugue, M.L., and Davison, A.G. (1992). Evidence for phosphatidylinositol hydrolysis in pancreatic islets stimulated with carbamoylcholine. Kinetic analysis of inositol polyphosphate metabolism. *The Biochemical journal* 285 (Pt 2), 541-549.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., et al. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *The Journal of cell biology* 163, 463-468.
- Bjorntorp, P. (1988). The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease. *Acta medica Scandinavica. Supplementum* 723, 121-134.
- Black, P.N., Faergeman, N.J., and DiRusso, C.C. (2000). Long-chain acyl-CoA-dependent regulation of gene expression in bacteria, yeast and mammals. *J Nutr* 130, 305S-309S.
- Blankman, J.L., Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & biology* 14, 1347-1356.
- Boden, G., and Chen, X. (1995). Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *The Journal of clinical investigation* 96, 1261-1268.
- Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C., and Lemieux, S. (2001). Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes* 50, 1612-1617.
- Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., and Ruderman, N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 54, 3458-3465.
- Bonen, A., Dohm, G.L., and van Loon, L.J. (2006). Lipid metabolism, exercise and insulin action. *Essays in biochemistry* 42, 47-59.

- Boni-Schnetzler, M., Thorne, J., Parnaud, G., Marselli, L., Ehses, J.A., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Halban, P.A., Weir, G.C., and Donath, M.Y. (2008). Increased interleukin (IL)-1 β messenger ribonucleic acid expression in β -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1 β in human islets by glucose and autostimulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93, 4065-4074.
- Boni, L.T., and Rando, R.R. (1985). The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols. *The Journal of biological chemistry* 260, 10819-10825.
- Bosma, M., Dapito, D.H., Drosatos-Tampakaki, Z., Huiping-Son, N., Huang, L.S., Kersten, S., Drosatos, K., and Goldberg, I.J. (2014). Sequestration of fatty acids in triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an in vitro model of cardiomyocyte lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1841, 1648-1655.
- Bou Khalil, M., Blais, A., Figeys, D., and Yao, Z. (2010). Lipin - The bridge between hepatic glycerolipid biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 1249-1259.
- Bouchard, C., Despres, J.P., and Mauriege, P. (1993). Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocrine reviews* 14, 72-93.
- Boucher, A., Lu, D., Burgess, S.C., Telemaque-Potts, S., Jensen, M.V., Mulder, H., Wang, M.Y., Unger, R.H., Sherry, A.D., and Newgard, C.B. (2004). Biochemical mechanism of lipid-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion and reversal with a malate analogue. *The Journal of biological chemistry* 279, 27263-27271.
- Bradley, D.C., and Kaslow, H.R. (1989). Radiometric assays for glycerol, glucose, and glycogen. *Analytical biochemistry* 180, 11-16.
- Bragdon, J.H., and Gordon, R.S., Jr. (1958). Tissue distribution of C14 after the intravenous injection of labeled chylomicrons and unesterified fatty acids in the rat. *J Clin Invest* 37, 574-578.
- Brand, M.D. (2005). The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochemical Society transactions* 33, 897-904.
- Brennan, L., Corless, M., Hewage, C., Malthouse, J.P., McClenaghan, N.H., Flatt, P.R., and Newsholme, P. (2003). ¹³C NMR analysis reveals a link between L-glutamine metabolism, D-glucose metabolism and gamma-glutamyl cycle activity in a clonal pancreatic β -cell line. *Diabetologia* 46, 1512-1521.
- Brennan, L., Shine, A., Hewage, C., Malthouse, J.P., Brindle, K.M., McClenaghan, N., Flatt, P.R., and Newsholme, P. (2002). A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative L-alanine metabolism and L-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic β -cell line: metabolism of L-alanine is important to the regulation of insulin secretion. *Diabetes* 51, 1714-1721.
- Briaud, I., Rouault, C., Reach, G., and Poitout, V. (1999). Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels. *Metabolism: clinical and experimental* 48, 319-323.

- Briscoe, C.P., Tadayyon, M., Andrews, J.L., Benson, W.G., Chambers, J.K., Eilert, M.M., Ellis, C., Elshourbagy, N.A., Goetz, A.S., Minnick, D.T., et al. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278, 11303-11311.
- Browning, J.D., and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114, 147-152.
- Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., and Hobbs, H.H. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40, 1387-1395.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Brun, T., Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B.E., Kim, K.H., and Prentki, M. (1996). Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes* 45, 190-198.
- Brunham, L.R., Kruit, J.K., Pape, T.D., Timmins, J.M., Reuwer, A.Q., Vasanji, Z., Marsh, B.J., Rodrigues, B., Johnson, J.D., Parks, J.S., et al. (2007). Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 13, 340-347.
- Brunham, L.R., Kruit, J.K., Verchere, C.B., and Hayden, M.R. (2008). Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 118, 403-408.
- Bruning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., and Kahn, C.R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Molecular cell* 2, 559-569.
- Buettner, C., Poci, A., Muse, E.D., Etgen, A.M., Myers, M.G., Jr., and Rossetti, L. (2006). Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab* 4, 49-60.
- Burgess, S.C., Hausler, N., Merritt, M., Jeffrey, F.M., Storey, C., Milde, A., Koshy, S., Lindner, J., Magnuson, M.A., Malloy, C.R., et al. (2004). Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 279, 48941-48949.
- Buse, M.G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 290, E1-E8.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.
- Calkin, A.C., and Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 213-224.
- Campbell, P.J., Carlson, M.G., and Nurjhan, N. (1994). Fat metabolism in human obesity. *The American journal of physiology* 266, E600-605.

- Caparros-Martin, J.A., McCarthy-Suarez, I., and Culianez-Macia, F.A. (2014). The kinetic analysis of the substrate specificity of motif 5 in a HAD hydrolase-type phosphosugar phosphatase of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 240, 479-487.
- Caparros-Martin, J.A., Reiland, S., Kochert, K., Cutanda, M.C., and Culianez-Macia, F.A. (2007). *Arabidopsis thaliana* AtGppl and AtGpp2: two novel low molecular weight phosphatases involved in plant glycerol metabolism. *Plant molecular biology* 63, 505-517.
- Capeau, J. (2008). Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes & metabolism* 34, 649-657.
- Caprio, S. (2002). Insulin resistance in childhood obesity. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 15 Suppl 1, 487-492.
- Caprio, S., Bronson, M., Sherwin, R.S., Rife, F., and Tamborlane, W.V. (1996). Co-existence of severe insulin resistance and hyperinsulinaemia in pre-adolescent obese children. *Diabetologia* 39, 1489-1497.
- Carley, A.N., and Kleinfeld, A.M. (2011). Fatty acid (FFA) transport in cardiomyocytes revealed by imaging unbound FFA is mediated by an FFA pump modulated by the CD36 protein. *J Biol Chem* 286, 4589-4597.
- Castedo, M., Ferri, K., Roumier, T., Metivier, D., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002). Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 265, 39-47.
- Cauchi, S., Choquet, H., Gutierrez-Aguilar, R., Capel, F., Grau, K., Proenca, C., Dina, C., Duval, A., Balkau, B., Marre, M., et al. (2008a). Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. *Obesity* 16, 476-482.
- Cauchi, S., Nead, K.T., Choquet, H., Horber, F., Potoczna, N., Balkau, B., Marre, M., Charpentier, G., Froguel, P., and Meyre, D. (2008b). The genetic susceptibility to type 2 diabetes may be modulated by obesity status: implications for association studies. *BMC medical genetics* 9, 45.
- Cha, J.Y., and Repa, J.J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282, 743-751.
- Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R., Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138, 476-488.
- Chakravarthy, M.V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2005). "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab* 1, 309-322.
- Chang, T.W., and Goldberg, A.L. (1978). The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *J Biol Chem* 253, 3685-3693.
- Chang, T.Y., Chang, C.C., Ohgami, N., and Yamauchi, Y. (2006). Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 129-157.

- Chapman, E.R., Blasi, J., An, S., Brose, N., Johnston, P.A., Sudhof, T.C., and Jahn, R. (1996). Fatty acylation of synaptotagmin in PC12 cells and synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 326-332.
- Chavez, J.A., Holland, W.L., Bar, J., Sandhoff, K., and Summers, S.A. (2005). Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. *The Journal of biological chemistry* 280, 20148-20153.
- Chavez, J.A., Knotts, T.A., Wang, L.P., Li, G., Dobrowsky, R.T., Florant, G.L., and Summers, S.A. (2003). A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 278, 10297-10303.
- Cheung, G.W., Kokorovic, A., Lam, C.K., Chari, M., and Lam, T.K. (2009). Intestinal cholecystokinin controls glucose production through a neuronal network. *Cell Metab* 10, 99-109.
- Choi, S.H., and Ginsberg, H.N. (2011). Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 22, 353-363.
- Christoffersen, C., Bollano, E., Lindegaard, M.L., Bartels, E.D., Goetze, J.P., Andersen, C.B., and Nielsen, L.B. (2003). Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 144, 3483-3490.
- Cnop, M., Hannaert, J.C., Hoorens, A., Eizirik, D.L., and Pipeleers, D.G. (2001). Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50, 1771-1777.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519-1523.
- Coleman, R.A. (2007). How do I fatten thee? Let me count the ways. *Cell metabolism* 5, 87-89.
- Collard, F., Baldin, F., Gerin, I., Bolsee, J., Noel, G., Graff, J., Veiga-da-Cunha, M., Stroobant, V., Vertommen, D., Houddane, A., et al. (2016). A conserved phosphatase destroys toxic glycolytic side products in mammals and yeast. *Nat Chem Biol* 12, 601-607.
- Conarello, S.L., Jiang, G., Mu, J., Li, Z., Woods, J., Zychband, E., Ronan, J., Liu, F., Roy, R.S., Zhu, L., et al. (2007). Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia. *Diabetologia* 50, 142-150.
- Consortium, C.A.D., Deloukas, P., Kanoni, S., Willenborg, C., Farrall, M., Assimes, T.L., Thompson, J.R., Ingelsson, E., Saleheen, D., Erdmann, J., et al. (2013). Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 45, 25-33.
- Corkey, B.E., Glennon, M.C., Chen, K.S., Deeney, J.T., Matschinsky, F.M., and Prentki, M. (1989). A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 264, 21608-21612.

- Covington, D.K., Briscoe, C.A., Brown, A.J., and Jayawickreme, C.K. (2006). The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochemical Society transactions* 34, 770-773.
- Crespin, S.R., Greenough, W.B., 3rd, and Steinberg, D. (1969). Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids. *J Clin Invest* 48, 1934-1943.
- de Alvaro, C., Teruel, T., Hernandez, R., and Lorenzo, M. (2004). Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 279, 17070-17078.
- de Luca, C., and Olefsky, J.M. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 582, 97-105.
- Deeney, J.T., Prentki, M., and Corkey, B.E. (2000). Metabolic control of beta-cell function. *Seminars in cell & developmental biology* 11, 267-275.
- DeFronzo, R.A., Bonadonna, R.C., and Ferrannini, E. (1992). Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes care* 15, 318-368.
- Delghingaro-Augusto, V., Decary, S., Peyot, M.L., Latour, M.G., Lamontagne, J., Paradis-Isler, N., Lacharite-Lemieux, M., Akakpo, H., Birot, O., Nolan, C.J., et al. (2012). Voluntary running exercise prevents beta-cell failure in susceptible islets of the Zucker diabetic fatty rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E254-264.
- Delghingaro-Augusto, V., Nolan, C.J., Gupta, D., Jetton, T.L., Latour, M.G., Peshavaria, M., Madiraju, S.R., Joly, E., Peyot, M.L., Prentki, M., et al. (2009). Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia* 52, 1122-1132.
- Denechaud, P.D., Bossard, P., Lobaccaro, J.M., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., and Postic, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118, 956-964.
- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Fofelle, F., Dyck, J.R., Girard, J., and Postic, C. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55, 2159-2170.
- Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Fofelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., and Ferre, P. (2012). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol* 56, 199-209.
- Ditlecadet, D., and Driedzic, W.R. (2013). Glycerol-3-phosphatase and not lipid recycling is the primary pathway in the accumulation of high concentrations of glycerol in rainbow smelt (*Osmerus mordax*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304, R304-312.

- Ditlecadet, D., and Driedzic, W.R. (2014). Glycerol synthesis in freeze-resistant rainbow smelt: towards the characterization of a key enzyme glycerol-3-phosphatase. *Fish physiology and biochemistry* *40*, 257-266.
- Dixon, G., Nolan, J., McClenaghan, N., Flatt, P.R., and Newsholme, P. (2003). A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11 - the functional significance of L-alanine. *J Endocrinol* *179*, 447-454.
- Doherty, M., and Malaisse, W.J. (2001). Glycogen accumulation in rat pancreatic islets: in vitro experiments. *Endocrine* *14*, 303-309.
- Donath, M.Y., Gross, D.J., Cerasi, E., and Kaiser, N. (1999). Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* *48*, 738-744.
- Donath, M.Y., Schumann, D.M., Faulenbach, M., Ellingsgaard, H., Perren, A., and Ehses, J.A. (2008). Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes care* *31 Suppl 2*, S161-164.
- Donath, M.Y., Storling, J., Maedler, K., and Mandrup-Poulsen, T. (2003). Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *Journal of molecular medicine* *81*, 455-470.
- Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., et al. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal of clinical investigation* *103*, 253-259.
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., and Dufer, M. (2010). Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol* *654*, 115-163.
- Duplus, E., Glorian, M., and Forest, C. (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *The Journal of biological chemistry* *275*, 30749-30752.
- Dyachok, O., Idevall-Hagren, O., Sagetorp, J., Tian, G., Wuttke, A., Arrieumerlou, C., Akusjarvi, G., Gylfe, E., and Tengholm, A. (2008). Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion. *Cell Metab* *8*, 26-37.
- Dzhura, I., Chepurny, O.G., Leech, C.A., Roe, M.W., Dzhura, E., Xu, X., Lu, Y., Schwede, F., Genieser, H.G., Smrcka, A.V., et al. (2011). Phospholipase C-epsilon links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans. *Islets* *3*, 121-128.
- Ebeling, P., Koistinen, H.A., and Koivisto, V.A. (1998). Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS letters* *436*, 301-303.
- Egea, P.F., Stroud, R.M., and Walter, P. (2005). Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 213-220.

- Ehses, J.A., Ellingsgaard, H., Boni-Schnetzler, M., and Donath, M.Y. (2009). Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction. *Archives of physiology and biochemistry* *115*, 240-247.
- Ehses, J.A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., Gueripel, X., Ellingsgaard, H., Schneider, M.K., Biollaz, G., et al. (2007). Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* *56*, 2356-2370.
- Eichmann, T.O., Kumari, M., Haas, J.T., Farese, R.V., Jr., Zimmermann, R., Lass, A., and Zechner, R. (2012). Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases. *J Biol Chem* *287*, 41446-41457.
- El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M.L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaiibo, G., Rosenberg, L., and Prentki, M. (2003). Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* *144*, 4154-4163.
- El-Assaad, W., Joly, E., Barbeau, A., Sladek, R., Buteau, J., Maestre, I., Pepin, E., Zhao, S., Iglesias, J., Roche, E., et al. (2010). Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells. *Endocrinology* *151*, 3061-3073.
- Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., Freidinger, K., Hilton, D.J., Hotamisligil, G.S., and Van Obberghen, E. (2001). SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *The Journal of biological chemistry* *276*, 47944-47949.
- Eriksson, J.W., Smith, U., Waagstein, F., Wysocki, M., and Jansson, P.A. (1999). Glucose turnover and adipose tissue lipolysis are insulin-resistant in healthy relatives of type 2 diabetes patients: is cellular insulin resistance a secondary phenomenon? *Diabetes* *48*, 1572-1578.
- Erion, D.M., Ignatova, I.D., Yonemitsu, S., Nagai, Y., Chatterjee, P., Weismann, D., Hsiao, J.J., Zhang, D., Iwasaki, T., Stark, R., et al. (2009). Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by knockdown of cAMP response element-binding protein. *Cell Metab* *10*, 499-506.
- Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., et al. (1999). Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* *283*, 981-985.
- Expert Panel on Detection, E., and Treatment of High Blood Cholesterol in, A. (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* *285*, 2486-2497.

- Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Magkos, F., Korenblat, K.M., Patterson, B.W., and Klein, S. (2008). Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134, 424-431.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., and Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51, 679-689.
- Faergeman, N.J., and Knudsen, J. (1997). Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *The Biochemical journal* 323 (Pt 1), 1-12.
- Fahien, L.A., MacDonald, M.J., Kmietek, E.H., Mertz, R.J., and Fahien, C.M. (1988). Regulation of insulin release by factors that also modify glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 263, 13610-13614.
- Fajans, S.S., Bell, G.I., and Polonsky, K.S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *The New England journal of medicine* 345, 971-980.
- Fan, J., Whiteway, M., and Shen, S.H. (2005). Disruption of a gene encoding glycerol 3-phosphatase from *Candida albicans* impairs intracellular glycerol accumulation-mediated salt-tolerance. *FEMS Microbiol Lett* 245, 107-116.
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942-1945.
- Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., and Prentki, M. (2000). Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49, 718-726.
- Fei, H., Zhao, B., Zhao, S., and Wang, Q. (2008). Requirements of calcium fluxes and ERK kinase activation for glucose- and interleukin-1 β -induced beta-cell apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* 315, 75-84.
- Feldstein, A.E. (2010). Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 30, 391-401.
- Ferdaoussi, M., Bergeron, V., Zarrouki, B., Kolic, J., Cantley, J., Fielitz, J., Olson, E.N., Prentki, M., Biden, T., MacDonald, P.E., et al. (2012). G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia* 55, 2682-2692.
- Ferdaoussi, M., Dai, X., Jensen, M.V., Wang, R., Peterson, B.S., Huang, C., Ilkayeva, O., Smith, N., Miller, N., Hajmrle, C., et al. (2015). Isocitrate-to-SEN1 signaling amplifies insulin secretion and rescues dysfunctional beta cells. *J Clin Invest* 125, 3847-3860.
- Fonseca, S.G., Gromada, J., and Urano, F. (2011). Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22, 266-274.

- Fontes, G., Semache, M., Hagman, D.K., Tremblay, C., Shah, R., Rhodes, C.J., Rutter, J., and Poitout, V. (2009). Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 58, 2048-2058.
- Foster, D.A. (2007). Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer research* 67, 1-4.
- Frayling, T.M. (2007). Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nature reviews. Genetics* 8, 657-662.
- Freeman, H., Shimomura, K., Horner, E., Cox, R.D., and Ashcroft, F.M. (2006). Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Metab* 3, 35-45.
- Freemantle, E., Vandal, M., Tremblay-Mercier, J., Tremblay, S., Blachere, J.C., Begin, M.E., Brenna, J.T., Windust, A., and Cunnane, S.C. (2006). Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 213-220.
- Fridlyand, L.E., Ma, L., and Philipson, L.H. (2005). Adenine nucleotide regulation in pancreatic beta-cells: modeling of ATP/ADP-Ca²⁺ interactions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E839-848.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., and Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry* 18, 499-502.
- Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., et al. (1993). Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 328, 697-702.
- Fruhbeck, G. (2005). Obesity: aquaporin enters the picture. *Nature* 438, 436-437.
- Fu, Z., Gilbert, E.R., and Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 9, 25-53.
- Fukami, A., Seino, Y., Ozaki, N., Yamamoto, M., Sugiyama, C., Sakamoto-Miura, E., Himeno, T., Takagishi, Y., Tsunekawa, S., Ali, S., et al. (2013). Ectopic expression of GIP in pancreatic beta-cells maintains enhanced insulin secretion in mice with complete absence of proglucagon-derived peptides. *Diabetes* 62, 510-518.
- Fukao, T., Mitchell, G., Sass, J.O., Hori, T., Orii, K., and Aoyama, Y. (2014). Ketone body metabolism and its defects. *J Inherit Metab Dis* 37, 541-551.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 114, 1752-1761.
- Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M.J., and Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *The Journal of biological chemistry* 277, 48115-48121.

- Gao, Z., Zuberi, A., Quon, M.J., Dong, Z., and Ye, J. (2003). Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *The Journal of biological chemistry* 278, 24944-24950.
- Gaussin, V., Hue, L., Stalmans, W., and Bollen, M. (1996). Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg^{2+} is mediated by protein phosphatase-2A. *The Biochemical journal* 316 (Pt 1), 217-224.
- Gauthier, M.S., Miyoshi, H., Souza, S.C., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Greenberg, A.S., and Ruderman, N.B. (2008). AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem* 283, 16514-16524.
- Gauthier, M.S., Perusse, J.R., Lavoie, M.E., Sladek, R., Madiraju, S.R., Ruderman, N.B., Coulombe, B., Prentki, M., and Rabasa-Lhoret, R. (2014). Increased subcutaneous adipose tissue expression of genes involved in glycerolipid-fatty acid cycling in obese insulin-resistant versus -sensitive individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E2518-2528.
- Gehrmann, W., Elsner, M., and Lenzen, S. (2010). Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2, 149-158.
- Gelding, S.V., Coldham, N., Niththyananthan, R., Anyaoku, V., and Johnston, D.G. (1995). Insulin resistance with respect to lipolysis in non-diabetic relatives of European patients with type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 12, 66-73.
- Gelling, R.W., Du, X.Q., Dichmann, D.S., Romer, J., Huang, H., Cui, L., Obici, S., Tang, B., Holst, J.J., Fledelius, C., et al. (2003). Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1438-1443.
- Ghosh, A., Ronner, P., Cheong, E., Khalid, P., and Matschinsky, F.M. (1991). The role of ATP and free ADP in metabolic coupling during fuel-stimulated insulin release from islet beta-cells in the isolated perfused rat pancreas. *J Biol Chem* 266, 22887-22892.
- Giddings, S.J., Chirgwin, J., and Permutt, M.A. (1982). Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes* 31, 624-629.
- Goldberg, I.J., and Dansky, H.M. (2006). Diabetic vascular disease: an experimental objective. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1693-1701.
- Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M., and Creager, M.A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114, 597-605.
- Goni, F.M., and Alonso, A. (1999). Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Progress in lipid research* 38, 1-48.
- Gonzalo, S., and Linder, M.E. (1998). SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway. *Mol Biol Cell* 9, 585-597.

- Gooding, J.R., Jensen, M.V., and Newgard, C.B. (2016). Metabolomics applied to the pancreatic islet. *Arch Biochem Biophys* 589, 120-130.
- Gorin, E., Tal-Or, Z., and Shafrir, E. (1969). Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats. *Eur J Biochem* 8, 370-375.
- Grankvist, K., Marklund, S.L., and Taljedal, I.B. (1981). CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *The Biochemical journal* 199, 393-398.
- Griffen, S.C., Wang, J., and German, M.S. (2001). A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes* 50, 63-68.
- Groop, L.C., Bonadonna, R.C., DelPrato, S., Ratheiser, K., Zyck, K., Ferrannini, E., and DeFronzo, R.A. (1989). Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 84, 205-213.
- Guan, H.P., Li, Y., Jensen, M.V., Newgard, C.B., Stepan, C.M., and Lazar, M.A. (2002). A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nature medicine* 8, 1122-1128.
- Guay, C., Joly, E., Pepin, E., Barbeau, A., Hentsch, L., Pineda, M., Madiraju, S.R., Brunengraber, H., and Prentki, M. (2013). A role for cytosolic isocitrate dehydrogenase as a negative regulator of glucose signaling for insulin secretion in pancreatic ss-cells. *PLoS One* 8, e77097.
- Guay, C., Madiraju, S.R., Aumais, A., Joly, E., and Prentki, M. (2007). A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 282, 35657-35665.
- Guey, L.T., Kravic, J., Melander, O., Burt, N.P., Laramie, J.M., Lyssenko, V., Jonsson, A., Lindholm, E., Tuomi, T., Isomaa, B., et al. (2011). Power in the phenotypic extremes: a simulation study of power in discovery and replication of rare variants. *Genetic epidemiology* 35, 236-246.
- Haber, C.A., Lam, T.K., Yu, Z., Gupta, N., Goh, T., Bogdanovic, E., Giacca, A., and Fantus, I.G. (2003). N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285, E744-753.
- Haber, E.P., Procopio, J., Carvalho, C.R., Carpinelli, A.R., Newsholme, P., and Curi, R. (2006). New insights into fatty acid modulation of pancreatic beta-cell function. *International review of cytology* 248, 1-41.
- Haeusler, R.A., Kaestner, K.H., and Accili, D. (2010). FoxOs function synergistically to promote glucose production. *J Biol Chem* 285, 35245-35248.
- Hagman, D.K., Hays, L.B., Parazzoli, S.D., and Poirier, V. (2005). Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 280, 32413-32418.

- Halse, R., Fryer, L.G., McCormack, J.G., Carling, D., and Yeaman, S.J. (2003). Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen: a possible role for AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 52, 9-15.
- Hamilton, J.A., and Kamp, F. (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48, 2255-2269.
- Hancock, A.S., Du, A., Liu, J., Miller, M., and May, C.L. (2010). Glucagon deficiency reduces hepatic glucose production and improves glucose tolerance in adult mice. *Mol Endocrinol* 24, 1605-1614.
- Hara-Chikuma, M., Sohara, E., Rai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Sasaki, S., Uchida, S., and Verkman, A.S. (2005). Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem* 280, 15493-15496.
- Harada, N., Oda, Z., Hara, Y., Fujinami, K., Okawa, M., Ohbuchi, K., Yonemoto, M., Ikeda, Y., Ohwaki, K., Aragane, K., et al. (2007). Hepatic de novo lipogenesis is present in liver-specific ACC1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 27, 1881-1888.
- Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., and Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Molecular cell* 7, 1153-1163.
- Harmon, J.S., Gleason, C.E., Tanaka, Y., Poitout, V., and Robertson, R.P. (2001). Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 50, 2481-2486.
- Harris, M.I., Hadden, W.C., Knowler, W.C., and Bennett, P.H. (1987). Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 yr. *Diabetes* 36, 523-534.
- Hasan, N.M., Longacre, M.J., Seed Ahmed, M., Kendrick, M.A., Gu, H., Ostenson, C.G., Fukao, T., and MacDonald, M.J. (2010). Lower succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase (SCOT) and ATP citrate lyase in pancreatic islets of a rat model of type 2 diabetes: knockdown of SCOT inhibits insulin release in rat insulinoma cells. *Arch Biochem Biophys* 499, 62-68.
- Hasan, N.M., Longacre, M.J., Stoker, S.W., Boonsaen, T., Jitrapakdee, S., Kendrick, M.A., Wallace, J.C., and MacDonald, M.J. (2008). Impaired anaplerosis and insulin secretion in insulinoma cells caused by small interfering RNA-mediated suppression of pyruvate carboxylase. *The Journal of biological chemistry* 283, 28048-28059.
- He, Q., Qiao, D., Bai, L., Zhang, Q., Yang, W., Li, Q., and Cao, Y. (2007). Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*. *J Plant Physiol* 164, 214-220.

- He, Y., Meng, X., Fan, Q., Sun, X., Xu, Z., and Song, R. (2009). Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis*. *Plant Mol Biol* 71, 193-205.
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W.Z., Strowig, T., Thaiss, C.A., Kau, A.L., Eisenbarth, S.C., Jurczak, M.J., et al. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482, 179-185.
- Henquin, J.C. (2011). The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in beta-cells. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S27-31.
- Henquin, J.C., Nenquin, M., Ravier, M.A., and Szollosi, A. (2009). Shortcomings of current models of glucose-induced insulin secretion. *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4, 168-179.
- Herder, C., and Donath, M.Y. (2015). Interleukin-1 receptor antagonist: friend or foe to the heart? *The lancet. Diabetes & endocrinology* 3, 228-229.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183.
- Hibuse, T., Maeda, N., Funahashi, T., Yamamoto, K., Nagasawa, A., Mizunoya, W., Kishida, K., Inoue, K., Kuriyama, H., Nakamura, T., et al. (2005). Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10993-10998.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., et al. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97, 889-901.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 300-372.
- Hohmeier, H.E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., and Newgard, C.B. (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49, 424-430.
- Hollenback, D., Bonham, L., Law, L., Rossnagle, E., Romero, L., Carew, H., Tompkins, C.K., Leung, D.W., Singer, J.W., and White, T. (2006). Substrate specificity of lysophosphatidic acid acyltransferase beta -- evidence from membrane and whole cell assays. *Journal of lipid research* 47, 593-604.
- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B.N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., et al. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nature genetics* 17, 384-385.

- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.
- Hotamisligil, G.S. (2005). Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2, S73-78.
- Hotamisligil, G.S., and Erbay, E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature reviews. Immunology* 8, 923-934.
- Hou, Z.Q., Li, H.L., Gao, L., Pan, L., Zhao, J.J., and Li, G.W. (2008). Involvement of chronic stresses in rat islet and INS-1 cell glucotoxicity induced by intermittent high glucose. *Molecular and cellular endocrinology* 291, 71-78.
- Huang, H.P., Chu, K., Nemoz-Gaillard, E., Elberg, D., and Tsai, M.J. (2002). Neogenesis of beta-cells in adult BETA2/NeuroD-deficient mice. *Mol Endocrinol* 16, 541-551.
- Huang, M., and Joseph, J.W. (2012). Metabolomic analysis of pancreatic beta-cell insulin release in response to glucose. *Islets* 4, 210-222.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7281-7286.
- Iizuka, K., Miller, B., and Uyeda, K. (2006). Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E358-364.
- Iizuka, K., Nakajima, H., Namba, M., Miyagawa, J., Miyazaki, J., Hanafusa, T., and Matsuzawa, Y. (2002). Metabolic consequence of long-term exposure of pancreatic beta cells to free fatty acid with special reference to glucose insensitivity. *Biochimica et biophysica acta* 1586, 23-31.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., et al. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2, 217-225.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H.Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., et al. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49, 1939-1945.
- Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., et al. (2006). Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab* 3, 267-275.

- Ishigaki, S., Fonseca, S.G., Osowski, C.M., Jurczyk, A., Shearstone, J.R., Zhu, L.J., Permutt, M.A., Greiner, D.L., Bortell, R., and Urano, F. (2010). AATF mediates an antiapoptotic effect of the unfolded protein response through transcriptional regulation of AKT1. *Cell death and differentiation* 17, 774-786.
- Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., and Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 51, 2005-2011.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., et al. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-176.
- Ivarsson, R., Quintens, R., Dejonghe, S., Tsukamoto, K., in 't Veld, P., Renstrom, E., and Schuit, F.C. (2005). Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 54, 2132-2142.
- Jackson, S., Bagstaff, S.M., Lynn, S., Yeaman, S.J., Turnbull, D.M., and Walker, M. (2000). Decreased insulin responsiveness of glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells from insulin-resistant nondiabetic relatives of type 2 diabetic families. *Diabetes* 49, 1169-1177.
- Jelen, S., Gena, P., Lebeck, J., Rojek, A., Praetorius, J., Frokiaer, J., Fenton, R.A., Nielsen, S., Calamita, G., and Rutzler, M. (2012). Aquaporin-9 and urea transporter-A gene deletions affect urea transmembrane passage in murine hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, G1279-1287.
- Jensen, M.V., Joseph, J.W., Ilkayeva, O., Burgess, S., Lu, D., Ronnebaum, S.M., Odegaard, M., Becker, T.C., Sherry, A.D., and Newgard, C.B. (2006). Compensatory responses to pyruvate carboxylase suppression in islet beta-cells. Preservation of glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281, 22342-22351.
- Jensen, M.V., Joseph, J.W., Ronnebaum, S.M., Burgess, S.C., Sherry, A.D., and Newgard, C.B. (2008). Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1287-1297.
- Jiang, G., and Zhang, B.B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E671-678.
- Jin, E.S., Sherry, A.D., and Malloy, C.R. (2013). Metabolism of glycerol, glucose, and lactate in the citric acid cycle prior to incorporation into hepatic acylglycerols. *J Biol Chem* 288, 14488-14496.
- Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J.C., and MacDonald, M.J. (2010). Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 53, 1019-1032.
- Jonas, J.C., Bensellam, M., Duprez, J., Elouil, H., Guiot, Y., and Pascal, S.M. (2009). Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 11 Suppl 4, 65-81.

- Joy, S.V., Rodgers, P.T., and Scates, A.C. (2005). Incretin mimetics as emerging treatments for type 2 diabetes. *The Annals of pharmacotherapy* 39, 110-118.
- Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E., and Uyeda, K. (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5107-5112.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.
- Kahn, S.E. (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 4047-4058.
- Kahn, S.E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3-19.
- Kalhan, S.C., Mahajan, S., Burkett, E., Reshef, L., and Hanson, R.W. (2001). Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *J Biol Chem* 276, 12928-12931.
- Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferre, P., and Foulle, F. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 119, 1201-1215.
- Kaneto, H., Fujii, J., Myint, T., Miyazawa, N., Islam, K.N., Kawasaki, Y., Suzuki, K., Nakamura, M., Tatsumi, H., Yamasaki, Y., et al. (1996). Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *The Biochemical journal* 320 (Pt 3), 855-863.
- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., and Hori, M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48, 2398-2406.
- Kaneto, H., Katakami, N., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Sakamoto, K., Matsuoka, T.A., Matsuhisa, M., and Yamasaki, Y. (2007). Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxidants & redox signaling* 9, 355-366.
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277, 3829-3835.
- Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2001). Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13710-13715.
- Kelley, D.E., Mokan, M., and Mandarino, L.J. (1992). Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM. *Diabetes* 41, 698-706.

- Kellner-Weibel, G., Jerome, W.G., Small, D.M., Warner, G.J., Stoltenborg, J.K., Kearney, M.A., Corjay, M.H., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1998). Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 423-431.
- Kibbey, R.G., Pongratz, R.L., Romanelli, A.J., Wollheim, C.B., Cline, G.W., and Shulman, G.I. (2007). Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab* 5, 253-264.
- Kim, J.A., Yeh, D.C., Ver, M., Li, Y., Carranza, A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Harrington, M.A., and Quon, M.J. (2005). Phosphorylation of Ser24 in the pleckstrin homology domain of insulin receptor substrate-1 by Mouse Pelle-like kinase/interleukin-1 receptor-associated kinase: cross-talk between inflammatory signaling and insulin signaling that may contribute to insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* 280, 23173-23183.
- Kim, J.K. (2009). Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo. *Methods Mol Biol* 560, 221-238.
- Kim, W.H., Lee, J.W., Suh, Y.H., Lee, H.J., Lee, S.H., Oh, Y.K., Gao, B., and Jung, M.H. (2007). AICAR potentiates ROS production induced by chronic high glucose: roles of AMPK in pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Signal* 19, 791-805.
- Kim, Y., Yakunin, A.F., Kuznetsova, E., Xu, X., Pennycooke, M., Gu, J., Cheung, F., Proudfoot, M., Arrowsmith, C.H., Joachimiak, A., et al. (2004). Structure- and function-based characterization of a new phosphoglycolate phosphatase from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem* 279, 517-526.
- King, H., and Rewers, M. (1993). Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes care* 16, 157-177.
- Klemm, S., Zimmermann, S., Peschel, C., Mak, T.W., and Ruland, J. (2007). Bel10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 134-138.
- Klip, A., and Paquet, M.R. (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes care* 13, 228-243.
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., et al. (2007). Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 20, 351-358.
- Konner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., et al. (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5, 438-449.
- Kornberg, H.L. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* 99, 1-11.

- Koshkin, V., Wang, X., Scherer, P.E., Chan, C.B., and Wheeler, M.B. (2003). Mitochondrial functional state in clonal pancreatic beta-cells exposed to free fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 278, 19709-19715.
- Kostenis, E. (2004). Novel clusters of receptors for sphingosine-1-phosphate, sphingosylphosphorylcholine, and (lyso)-phosphatidic acid: new receptors for "old" ligands. *Journal of cellular biochemistry* 92, 923-936.
- Kotoulas, O.B., Kalamidas, S.A., and Kondomerkos, D.J. (2004). Glycogen autophagy. *Microsc Res Tech* 64, 10-20.
- Kotronen, A., Seppala-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Bergholm, R., Frayn, K.N., Fielding, B.A., and Yki-Jarvinen, H. (2009). Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver Int* 29, 1439-1446.
- Kowluru, A. (2003). Regulatory roles for small G proteins in the pancreatic beta-cell: lessons from models of impaired insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E669-684.
- Kowluru, A., Chen, H.Q., Modrick, L.M., and Stefanelli, C. (2001). Activation of acetyl-CoA carboxylase by a glutamate- and magnesium-sensitive protein phosphatase in the islet beta-cell. *Diabetes* 50, 1580-1587.
- Kraegen, E.W., Cooney, G.J., Ye, J.M., Thompson, A.L., and Furler, S.M. (2001). The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 109 Suppl 2, S189-201.
- Krebs, M., and Roden, M. (2004). Nutrient-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Current medicinal chemistry* 11, 901-908.
- Kruit, J.K., Wijesekara, N., Westwell-Roper, C., Vanmierlo, T., de Haan, W., Bhattacharjee, A., Tang, R., Wellington, C.L., LutJohann, D., Johnson, J.D., et al. (2012). Loss of both ABCA1 and ABCG1 results in increased disturbances in islet sterol homeostasis, inflammation, and impaired beta-cell function. *Diabetes* 61, 659-664.
- Ladriere, L., and Malaisse, W.J. (2001). Pancreatic glycogen content in Goto-Kakizaki rats. *Int J Mol Med* 7, 173-175.
- Lahiri, S.D., Zhang, G., Dai, J., Dunaway-Mariano, D., and Allen, K.N. (2004). Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain. *Biochemistry* 43, 2812-2820.
- Lamontagne, J., Pepin, E., Peyot, M.L., Joly, E., Ruderman, N.B., Poitout, V., Madiraju, S.R., Nolan, C.J., and Prentki, M. (2009). Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic beta-cell at submaximal glucose concentrations. *Endocrinology* 150, 3465-3474.

- Larrouy-Maumus, G., Biswas, T., Hunt, D.M., Kelly, G., Tsodikov, O.V., and de Carvalho, L.P. (2013). Discovery of a glycerol 3-phosphate phosphatase reveals glycerophospholipid polar head recycling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 11320-11325.
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., and Zechner, R. (2011). Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in lipid research* *50*, 14-27.
- Latour, M.G., Alquier, T., Oseid, E., Tremblay, C., Jetton, T.L., Luo, J., Lin, D.C., and Poitout, V. (2007). GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* *56*, 1087-1094.
- Lau, D.C. (2009). Riding the waves of change in the diabetes community. *Canadian journal of diabetes* *33*, 144-145.
- Laybutt, D.R., Preston, A.M., Akerfeldt, M.C., Kench, J.G., Busch, A.K., Biankin, A.V., and Biden, T.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* *50*, 752-763.
- Leahy, J.L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Archives of medical research* *36*, 197-209.
- Lebovitz, H.E., and Banerji, M.A. (2005). Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes care* *28*, 2322-2325.
- Leclerc, I., Woltersdorf, W.W., da Silva Xavier, G., Rowe, R.L., Cross, S.E., Korbitt, G.S., Rajotte, R.V., Smith, R., and Rutter, G.A. (2004). Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *286*, E1023-1031.
- Lee, J.M., Okumura, M.J., Davis, M.M., Herman, W.H., and Gurney, J.G. (2006). Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study. *Diabetes care* *29*, 2427-2432.
- Lee, Y.J., Ko, E.H., Kim, J.E., Kim, E., Lee, H., Choi, H., Yu, J.H., Kim, H.J., Seong, J.K., Kim, K.S., et al. (2012). Nuclear receptor PPARgamma-regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 13656-13661.
- Leloup, C., Tourrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.L., Ktorza, A., Casteilla, L., and Penicaud, L. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* *58*, 673-681.
- Leroyer, S.N., Tordjman, J., Chauvet, G., Quette, J., Chapron, C., Forest, C., and Antoine, B. (2006). Rosiglitazone controls fatty acid cycling in human adipose tissue by means of glyceroneogenesis and glycerol phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* *281*, 13141-13149.

- Li, N., Frigerio, F., and Maechler, P. (2008). The sensitivity of pancreatic beta-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress. *Biochemical Society transactions* 36, 930-934.
- Li, P.F., Dietz, R., and von Harsdorf, R. (1997). Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 96, 3602-3609.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y., et al. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 13, 376-388.
- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., and Feldstein, A.E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 284, 5637-5644.
- Lichtman, A.H., and Cravatt, B.F. (2005). Food for thought: endocannabinoid modulation of lipogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115, 1130-1133.
- Liew, C.W., Bochenski, J., Kawamori, D., Hu, J., Leech, C.A., Wanic, K., Malecki, M., Warram, J.H., Qi, L., Krolewski, A.S., et al. (2010). The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse beta cells. *The Journal of clinical investigation* 120, 2876-2888.
- Lillioja, S., Mott, D.M., Howard, B.V., Bennett, P.H., Yki-Jarvinen, H., Freymond, D., Nyomba, B.L., Zurlo, F., Swinburn, B., and Bogardus, C. (1988). Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *The New England journal of medicine* 318, 1217-1225.
- Lin, E.C. (1977). Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annu Rev Biochem* 46, 765-795.
- Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T., Wu, P.H., Handschin, C., Li, S., Yang, W., Pei, L., Uldry, M., Tontonoz, P., et al. (2005). Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell* 120, 261-273.
- Lipson, K.L., Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Nguyen, L.X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A.A., and Urano, F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell metabolism* 4, 245-254.
- Lipson, K.L., Ghosh, R., and Urano, F. (2008). The role of IRE1 α in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. *PloS one* 3, e1648.
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Jr., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3077-3082.
- Liu, S., Hatano, B., Zhao, M., Yen, C.C., Kang, K., Reilly, S.M., Gangl, M.R., Gorgun, C., Balschi, J.A., Ntambi, J.M., et al. (2011). Role of peroxisome proliferator-activated receptor δ / β in hepatic metabolic regulation. *J Biol Chem* 286, 1237-1247.

- Liu, Y.Q., Jetton, T.L., and Leahy, J.L. (2002). beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *The Journal of biological chemistry* 277, 39163-39168.
- Liu, Y.Q., Tornheim, K., and Leahy, J.L. (1999). Glucose-fatty acid cycle to inhibit glucose utilization and oxidation is not operative in fatty acid-cultured islets. *Diabetes* 48, 1747-1753.
- Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Barrientos, G., Valencia, M., Mears, D., and Hidalgo, C. (2015a). Correction: Glucose-Dependent Insulin Secretion in Pancreatic beta-Cell Islets from Male Rats Requires Ca²⁺ Release via ROS-Stimulated Ryanodine Receptors [corrected]. *PLoS One* 10, e0140198.
- Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Barrientos, G., Valencia, M., Mears, D., and Hidalgo, C. (2015b). Glucose-Dependent Insulin Secretion in Pancreatic beta-Cell Islets from Male Rats Requires Ca²⁺ Release via ROS-Stimulated Ryanodine Receptors. *PLoS One* 10, e0129238.
- Long, S.D., and Pekala, P.H. (1996). Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E₂. *The Journal of biological chemistry* 271, 1138-1144.
- Lorenz, M.A., El Azzouny, M.A., Kennedy, R.T., and Burant, C.F. (2013). Metabolome response to glucose in the beta-cell line INS-1 832/13. *J Biol Chem* 288, 10923-10935.
- Lortz, S., Gurgul-Convey, E., Naujok, O., and Lenzen, S. (2013). Overexpression of the antioxidant enzyme catalase does not interfere with the glucose responsiveness of insulin-secreting INS-1E cells and rat islets. *Diabetologia* 56, 774-782.
- Loubatieres-Mariani, M.M., Chapal, J., Lignon, F., and Valette, G. (1979). Structural specificity of nucleotides for insulin secretory action from the isolated perfused rat pancreas. *Eur J Pharmacol* 59, 277-286.
- Lu, X., Liu, J., Hou, F., Liu, Z., Cao, X., Seo, H., and Gao, B. (2011). Cholesterol induces pancreatic beta cell apoptosis through oxidative stress pathway. *Cell Stress Chaperones* 16, 539-548.
- MacDonald, M.J. (1995). Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* 270, 20051-20058.
- MacDonald, M.J., Chaplen, F.W., Triplett, C.K., Gong, Q., and Drought, H. (2006). Stimulation of insulin release by glyceraldehyde may not be similar to glucose. *Arch Biochem Biophys* 447, 118-126.
- MacDonald, M.J., Dobrzyn, A., Ntambi, J., and Stoker, S.W. (2008). The role of rapid lipogenesis in insulin secretion: Insulin secretagogues acutely alter lipid composition of INS-1 832/13 cells. *Arch Biochem Biophys* 470, 153-162.
- MacDonald, M.J., Efendic, S., and Ostenson, C.G. (1996a). Normalization by insulin treatment of low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of the GK rat. *Diabetes* 45, 886-890.

- MacDonald, M.J., Fahien, L.A., Brown, L.J., Hasan, N.M., Buss, J.D., and Kendrick, M.A. (2005). Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E1-15.
- MacDonald, M.J., Longacre, M.J., Langberg, E.C., Tibell, A., Kendrick, M.A., Fukao, T., and Ostenson, C.G. (2009). Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 52, 1087-1091.
- MacDonald, M.J., and Marshall, L.K. (2000). Mouse lacking NAD⁺-linked glycerol phosphate dehydrogenase has normal pancreatic beta cell function but abnormal metabolite pattern in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 384, 143-153.
- MacDonald, M.J., Tang, J., and Polonsky, K.S. (1996b). Low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 45, 1626-1630.
- MacDonald, P.E., El-Kholy, W., Riedel, M.J., Salapatek, A.M., Light, P.E., and Wheeler, M.B. (2002a). The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes 51 Suppl 3*, S434-442.
- MacDonald, P.E., Salapatek, A.M., and Wheeler, M.B. (2002b). Glucagon-like peptide-1 receptor activation antagonizes voltage-dependent repolarizing K(+) currents in beta-cells: a possible glucose-dependent insulinotropic mechanism. *Diabetes 51 Suppl 3*, S443-447.
- MacDougald, O.A., and Burant, C.F. (2005). Obesity and metabolic perturbations after loss of aquaporin 7, the adipose glycerol transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10759-10760.
- Maddux, B.A., See, W., Lawrence, J.C., Jr., Goldfine, A.L., Goldfine, I.D., and Evans, J.L. (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 50, 404-410.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., et al. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510, 542-546.
- Maechler, P., Li, N., Casimir, M., Vetterli, L., Frigerio, F., and Brun, T. (2010). Role of mitochondria in beta-cell function and dysfunction. *Adv Exp Med Biol* 654, 193-216.
- Maechler, P., and Wollheim, C.B. (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402, 685-689.
- Maechler, P., and Wollheim, C.B. (2001). Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414, 807-812.
- Maedler, K., Fontana, A., Ris, F., Sergeev, P., Toso, C., Oberholzer, J., Lehmann, R., Bachmann, F., Tasinato, A., Spinas, G.A., et al. (2002a). FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human

pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 8236-8241.

Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., and Donath, M.Y. (2002b). Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of clinical investigation* *110*, 851-860.

Maedler, K., Spinas, G.A., Lehmann, R., Sergeev, P., Weber, M., Fontana, A., Kaiser, N., and Donath, M.Y. (2001). Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* *50*, 1683-1690.

Mairal, A., Langin, D., Arner, P., and Hoffstedt, J. (2006). Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* *49*, 1629-1636.

Malaisse, W.J., Marynissen, G., and Sener, A. (1992). Possible role of glycogen accumulation in B-cell glucotoxicity. *Metabolism* *41*, 814-819.

Malecki, M.T., Jhala, U.S., Antonellis, A., Fields, L., Doria, A., Orban, T., Saad, M., Warram, J.H., Montminy, M., and Krolewski, A.S. (1999). Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics* *23*, 323-328.

Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants & redox signaling* *9*, 2277-2293.

Mao, J., DeMayo, F.J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T.E., Kordari, P., Chirala, S.S., Heird, W.C., and Wakil, S.J. (2006). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 8552-8557.

Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A.M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Forlani, G., and Melchionda, N. (1999). Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* *107*, 450-455.

Marchesini, G., Marzocchi, R., Agostini, F., and Bugianesi, E. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* *16*, 421-427.

Mari, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., and Garcia-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* *4*, 185-198.

Martin, B.C., Warram, J.H., Krolewski, A.S., Bergman, R.N., Soeldner, J.S., and Kahn, C.R. (1992). Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* *340*, 925-929.

- Martins-Santos, M.E., Chaves, V.E., Frasson, D., Boschini, R.P., Garofalo, M.A., Kettelhut Ido, C., and Migliorini, R.H. (2007). Glyceroneogenesis and the supply of glycerol-3-phosphate for glyceride-glycerol synthesis in liver slices of fasted and diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1352-1357.
- Martins, E.F., Miyasaka, C.K., Newsholme, P., Curi, R., and Carpinelli, A.R. (2004). Changes of fatty acid composition in incubated rat pancreatic islets. *Diabetes Metab* 30, 21-27.
- Massa, M.L., Borelli, M.I., Del Zotto, H., and Gagliardino, J.J. (2001). Changes induced by sucrose administration on glucose metabolism in pancreatic islets in normal hamsters. *The Journal of endocrinology* 171, 551-556.
- Matias, I., Bisogno, T., and Di Marzo, V. (2006). Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 1, S7-S12.
- Matschinsky, F.M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223-241.
- Matsumoto, M., Pocai, A., Rossetti, L., Depinho, R.A., and Accili, D. (2007). Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab* 6, 208-216.
- Matsumura, K., Chang, B.H., Fujimiya, M., Chen, W., Kulkarni, R.N., Eguchi, Y., Kimura, H., Kojima, H., and Chan, L. (2007). Aquaporin 7 is a beta-cell protein and regulator of intraislet glycerol content and glycerol kinase activity, beta-cell mass, and insulin production and secretion. *Mol Cell Biol* 27, 6026-6037.
- Matsusue, K., Kusakabe, T., Noguchi, T., Takiguchi, S., Suzuki, T., Yamano, S., and Gonzalez, F.J. (2008). Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab* 7, 302-311.
- Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Kuba, M., Nakagawa, Y., Ishii, K., Shimada, M., et al. (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 56, 2199-2208.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.
- Maughan, R.J. (1982). A simple, rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20-mul blood sample. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 122, 231-240.
- McGarry, J.D. (2002). Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 7-18.

- McLoughlin, D.J., and MacQuarrie, R. (1978). Purification and properties of the major isozymic form of cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase from rabbit liver. *Biochimica et biophysica acta* 527, 204-211.
- Mehta, A., Oeser, A.M., and Carlson, M.G. (1998). Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 719, 9-23.
- Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45, 309-326.
- Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2014). AMPK α 1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. *Journal of hepatology* 60, 152-159.
- Messier, V., Karelis, A.D., Robillard, M.E., Bellefeuille, P., Brochu, M., Lavoie, J.M., and Rabasa-Lhoret, R. (2010). Metabolically healthy but obese individuals: relationship with hepatic enzymes. *Metabolism: clinical and experimental* 59, 20-24.
- Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6, 87-97.
- Miele, C., Riboulet, A., Maitan, M.A., Oriente, F., Romano, C., Formisano, P., Giudicelli, J., Beguinot, F., and Van Obberghen, E. (2003). Human glycosylated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C α -mediated mechanism. *The Journal of biological chemistry* 278, 47376-47387.
- Mikhail, N. (2009). The metabolic syndrome: insulin resistance. *Current hypertension reports* 11, 156-158.
- Mittendorfer, B., Magkos, F., Fabbrini, E., Mohammed, B.S., and Klein, S. (2009). Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity (Silver Spring)* 17, 1872-1877.
- Miyazaki, M., Flowers, M.T., Sampath, H., Chu, K., Otzelberger, C., Liu, X., and Ntambi, J.M. (2007). Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab* 6, 484-496.
- Moran-Salvador, E., Lopez-Parra, M., Garcia-Alonso, V., Titos, E., Martinez-Clemente, M., Gonzalez-Periz, A., Lopez-Vicario, C., Barak, Y., Arroyo, V., and Claria, J. (2011). Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J* 25, 2538-2550.
- Moriyama, M., Fujimoto, Y., Rikimaru, S., Ushikai, M., Kuroda, E., Kawabe, K., Takano, K., Asakawa, A., Inui, A., Eto, K., et al. (2015). Mechanism for increased hepatic glycerol synthesis in the

citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mouse: Urine glycerol and glycerol 3-phosphate as potential diagnostic markers of human citrin deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1852, 1787-1795.

Morris, A.P., Voight, B.F., Teslovich, T.M., Ferreira, T., Segre, A.V., Steinthorsdottir, V., Strawbridge, R.J., Khan, H., Grallert, H., Mahajan, A., et al. (2012). Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nature genetics* 44, 981-990.

Morris, D.L., and Rui, L. (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E1247-1259.

Moscatiello, S., Manini, R., and Marchesini, G. (2007). Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17, 63-70.

Mracek, T., Drahota, Z., and Houstek, J. (2013). The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1827, 401-410.

Mugabo, Y., Zhao, S., Seifried, A., Gezzar, S., Al-Mass, A., Zhang, D., Lamontagne, J., Attane, C., Poursharifi, P., Iglesias, J., et al. (2016). Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: Role in metabolism and signaling in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E430-439.

Muoio, D.M., and Newgard, C.B. (2008). Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 193-205.

Mutel, E., Abdul-Wahed, A., Ramamonjisoa, N., Stefanutti, A., Houberdon, I., Cavassila, S., Pilleul, F., Beuf, O., Gautier-Stein, A., Penhoat, A., et al. (2011). Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J Hepatol* 54, 529-537.

Nadkarni, P., Chepurny, O.G., and Holz, G.G. (2014). Regulation of glucose homeostasis by GLP-1. *Prog Mol Biol Transl Sci* 121, 23-65.

Nagai, Y., Yonemitsu, S., Erion, D.M., Iwasaki, T., Stark, R., Weismann, D., Dong, J., Zhang, D., Jurczak, M.J., Loffler, M.G., et al. (2009). The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metab* 9, 252-264.

Nagle, C.A., An, J., Shiota, M., Torres, T.P., Cline, G.W., Liu, Z.X., Wang, S., Catlin, R.L., Shulman, G.I., Newgard, C.B., et al. (2007). Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance. *J Biol Chem* 282, 14807-14815.

Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D.L., and Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108, 1359-1367.

- Nathan, D.M., Davidson, M.B., DeFronzo, R.A., Heine, R.J., Henry, R.R., Pratley, R., Zinman, B., and American Diabetes, A. (2007). Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes care* 30, 753-759.
- Nauck, M.A., and Meier, J.J. (2005). Glucagon-like peptide 1 and its derivatives in the treatment of diabetes. *Regul Pept* 128, 135-148.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11, 2323-2334.
- Newsholme, E.A., and Crabtree, B. (1976). Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation. *Biochemical Society symposium*, 61-109.
- Newsholme, P., Keane, D., Welters, H.J., and Morgan, N.G. (2007). Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)* 112, 27-42.
- Newsholme, P., Morgan, D., Rebelato, E., Oliveira-Emilio, H.C., Procopio, J., Curi, R., and Carpinelli, A. (2009). Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia* 52, 2489-2498.
- Nguyen, M.T., Satoh, H., Favelyukis, S., Babendure, J.L., Imamura, T., Sbodio, J.I., Zalevsky, J., Dahiya, B.I., Chi, N.W., and Olefsky, J.M. (2005). JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 280, 35361-35371.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.
- Nishizawa, M., Nakabayashi, H., Uehara, K., Nakagawa, A., Uchida, K., and Koya, D. (2013). Intraportal GLP-1 stimulates insulin secretion predominantly through the hepatoportal-pancreatic vagal reflex pathways. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 305, E376-387.
- Noel, R.J., Antinozzi, P.A., McGarry, J.D., and Newgard, C.B. (1997). Engineering of glycerol-stimulated insulin secretion in islet beta cells. Differential metabolic fates of glucose and glycerol provide insight into mechanisms of stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem* 272, 18621-18627.
- Noguchi, K., Ishii, S., and Shimizu, T. (2003). Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *The Journal of biological chemistry* 278, 25600-25606.
- Nolan, C.J., Leahy, J.L., Delghingaro-Augusto, V., Moibi, J., Soni, K., Peyot, M.L., Fortier, M., Guay, C., Lamontagne, J., Barbeau, A., et al. (2006a). Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* 49, 2120-2130.

- Nolan, C.J., Madiraju, M.S., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M.L., and Prentki, M. (2006b). Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 *Suppl* 2, S16-23.
- Nolan, C.J., and Prentki, M. (2008). The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab* 19, 285-291.
- Nolan, C.J., Ruderman, N.B., Kahn, S.E., Pedersen, O., and Prentki, M. (2015). Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes. *Diabetes* 64, 673-686.
- Nolan, C.J., Ruderman, N.B., and Prentki, M. (2013). Intensive insulin for type 2 diabetes: the risk of causing harm. *Lancet Diabetes Endocrinol* 1, 9-10.
- Norbeck, J., Pahlman, A.K., Akhtar, N., Blomberg, A., and Adler, L. (1996). Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 271, 13875-13881.
- Nye, C.K., Hanson, R.W., and Kalhan, S.C. (2008). Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J Biol Chem* 283, 27565-27574.
- Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D.G., and Rossetti, L. (2002a). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5, 566-572.
- Obici, S., Zhang, B.B., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002b). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8, 1376-1382.
- Ohneda, M., Inman, L.R., and Unger, R.H. (1995). Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents beta-cell depletion, loss of beta-cell GLUT 2 and glucose incompetence. *Diabetologia* 38, 173-179.
- Olivecrona, T. (1962). The metabolism of 1-C-14-palmitic acid in the rat. *Acta Physiol Scand* 54, 295-305.
- Olson, L.K., Redmon, J.B., Towle, H.C., and Robertson, R.P. (1993). Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *The Journal of clinical investigation* 92, 514-519.
- Olson, L.K., Sharma, A., Peshavaria, M., Wright, C.V., Towle, H.C., Robertson, R.P., and Stein, R. (1995). Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9127-9131.
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertaler, L., Wang, L., et al. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates

fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation* 115, 1298-1305.

Ota, T., Takamura, T., Kurita, S., Matsuzawa, N., Kita, Y., Uno, M., Akahori, H., Misu, H., Sakurai, M., Zen, Y., et al. (2007). Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 132, 282-293.

Owen, O.E., Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277, 30409-30412.

Ozcan, L., Wong, C.C., Li, G., Xu, T., Pajvani, U., Park, S.K., Wronska, A., Chen, B.X., Marks, A.R., Fukamizu, A., et al. (2012). Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity. *Cell Metab* 15, 739-751.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.

Pahlman, A.K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., and Adler, L. (2001). The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* 276, 3555-3563.

Palladino, A.A., and Stanley, C.A. (2010). The hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 11, 171-178.

Parker, J.C., Andrews, K.M., Allen, M.R., Stock, J.L., and McNeish, J.D. (2002). Glycemic control in mice with targeted disruption of the glucagon receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 839-843.

Pepin, E., Al-Mass, A., Attane, C., Zhang, K., Lamontagne, J., Lussier, R., Madiraju, S.R., Joly, E., Ruderman, N.B., Sladek, R., et al. (2016). Pancreatic beta-Cell Dysfunction in Diet-Induced Obese Mice: Roles of AMP-Kinase, Protein Kinase Cepsilon, Mitochondrial and Cholesterol Metabolism, and Alterations in Gene Expression. *PLoS One* 11, e0153017.

Perry, J.R., Voight, B.F., Yengo, L., Amin, N., Dupuis, J., Ganser, M., Grallert, H., Navarro, P., Li, M., Qi, L., et al. (2012). Stratifying type 2 diabetes cases by BMI identifies genetic risk variants in LAMA1 and enrichment for risk variants in lean compared to obese cases. *PLoS genetics* 8, e1002741.

Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Lehrke, M., Hendler, R.E., and Shulman, G.I. (2005). Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 603-608.

Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2006). Etiology of insulin resistance. *The American journal of medicine* 119, S10-16.

- Peyot, M.L., Gray, J.P., Lamontagne, J., Smith, P.J., Holz, G.G., Madiraju, S.R., Prentki, M., and Heart, E. (2009a). Glucagon-like peptide-1 induced signaling and insulin secretion do not drive fuel and energy metabolism in primary rodent pancreatic beta-cells. *PloS one* 4, e6221.
- Peyot, M.L., Guay, C., Latour, M.G., Lamontagne, J., Lussier, R., Pineda, M., Ruderman, N.B., Haemmerle, G., Zechner, R., Joly, E., et al. (2009b). Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 284, 16848-16859.
- Peyot, M.L., Nolan, C.J., Soni, K., Joly, E., Lussier, R., Corkey, B.E., Wang, S.P., Mitchell, G.A., and Prentki, M. (2004). Hormone-sensitive lipase has a role in lipid signaling for insulin secretion but is nonessential for the incretin action of glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 53, 1733-1742.
- Peyot, M.L., Pepin, E., Lamontagne, J., Latour, M.G., Zarrouki, B., Lussier, R., Pineda, M., Jetton, T.L., Madiraju, S.R., Joly, E., et al. (2010). Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes* 59, 2178-2187.
- Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L.M., Daniel, K., Reece, J.M., Deeney, J.T., Andersen, M.E., Corkey, B.E., et al. (2007). Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56, 1783-1791.
- Poitout, V. (2003). The ins and outs of fatty acids on the pancreatic beta cell. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14, 201-203.
- Poitout, V. (2008). Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochemical Society transactions* 36, 901-904.
- Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., and Fontes, G. (2010). Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 289-298.
- Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R.P., and Harmon, J.S. (2006). Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *The Journal of nutrition* 136, 873-876.
- Poitout, V., and Robertson, R.P. (2002). Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143, 339-342.
- Poitout, V., and Robertson, R.P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocrine reviews* 29, 351-366.
- Pold, R., Jensen, L.S., Jessen, N., Buhl, E.S., Schmitz, O., Flyvbjerg, A., Fujii, N., Goodyear, L.J., Gotfredsen, C.F., Brand, C.L., et al. (2005). Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. *Diabetes* 54, 928-934.
- Polonsky, K.S., Sturis, J., and Bell, G.I. (1996). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *The New England journal of medicine* 334, 777-783.

- Pongratz, R.L., Kibbey, R.G., Shulman, G.I., and Cline, G.W. (2007). Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *J Biol Chem* 282, 200-207.
- Ponugoti, B., Kim, D.H., Xiao, Z., Smith, Z., Miao, J., Zang, M., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Veenstra, T.D., and Kemper, J.K. (2010). SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* 285, 33959-33970.
- Porte, D., Jr. (2001). Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes/metabolism research and reviews* 17, 181-188.
- Potthoff, M.J., Boney-Montoya, J., Choi, M., He, T., Sunny, N.E., Satapati, S., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Gerard, R.D., Finck, B.N., et al. (2011). FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 α pathway. *Cell Metab* 13, 729-738.
- Prentki, M. (1996). New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134, 272-286.
- Prentki, M., and Corkey, B.E. (1996). Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45, 273-283.
- Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., and Roduit, R. (2002). Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3, S405-413.
- Prentki, M., and Madiraju, S.R. (2008). Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev* 29, 647-676.
- Prentki, M., and Madiraju, S.R. (2012). Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 353, 88-100.
- Prentki, M., and Matschinsky, F.M. (1987). Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 67, 1185-1248.
- Prentki, M., Matschinsky, F.M., and Madiraju, S.R. (2013). Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab* 18, 162-185.
- Prentki, M., and Nolan, C.J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-1812.
- Prentki, M., Segall, L., Roche, E., Thumelin, S., Brun, T., McGarry, J.D., Corkey, B.E., and Assimacopoulos-Jeannet, F. (1998). [Gluco-lipotoxicity and gene expression in the pancreatic beta cell]. *Journées annuelles de diabetologie de l'Hotel-Dieu*, 17-27.
- Prentki, M., Vischer, S., Glennon, M.C., Regazzi, R., Deeney, J.T., and Corkey, B.E. (1992). Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *The Journal of biological chemistry* 267, 5802-5810.

- Previs, S.F., Fernandez, C.A., Yang, D., Soloviev, M.V., David, F., and Brunengraber, H. (1995). Limitations of the mass isotopomer distribution analysis of glucose to study gluconeogenesis. Substrate cycling between glycerol and triose phosphates in liver. *J Biol Chem* 270, 19806-19815.
- Produit-Zengaffinen, N., Davis-Lameloise, N., Perreten, H., Becard, D., Gjinovci, A., Keller, P.A., Wollheim, C.B., Herrera, P., Muzzin, P., and Assimacopoulos-Jeannet, F. (2007). Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia* 50, 84-93.
- Proks, P., de Wet, H., and Ashcroft, F.M. (2010). Activation of the K(ATP) channel by Mg-nucleotide interaction with SUR1. *J Gen Physiol* 136, 389-405.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423, 550-555.
- Puttmann, M., Krug, H., von Ochsenstein, E., and Kattermann, R. (1993). Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. *Clinical chemistry* 39, 825-832.
- Qian, B., Wang, H., Men, X., Zhang, W., Cai, H., Xu, S., Xu, Y., Ye, L., Wollheim, C.B., and Lou, J. (2008). TRIB3 [corrected] is implicated in glucotoxicity- and endoplasmic reticulum-stress-induced [corrected] beta-cell apoptosis. *The Journal of endocrinology* 199, 407-416.
- Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., Rosenbaum, M., Zhao, Y., Gu, W., Farmer, S.R., et al. (2012). Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppargamma. *Cell* 150, 620-632.
- Rancoule, C., Attane, C., Gres, S., Fournel, A., Dusaulcy, R., Bertrand, C., Vinel, C., Treguer, K., Prentki, M., Valet, P., et al. (2013). Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice. *Diabetologia* 56, 1394-1402.
- Rasschaert, J., and Malaisse, W.J. (2001). Glycogen accumulation in cultured tumoral or normal pancreatic islet and acinar cells. *Int J Mol Med* 8, 63-65.
- Ray, P.D., Huang, B.W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24, 981-990.
- Raymond, J. (1995). Glycerol synthesis in the rainbow smelt *Osmerus mordax*. *J Exp Biol* 198, 2569-2573.
- Raymond, J.A. (2015). Two potential fish glycerol-3-phosphate phosphatases. *Fish Physiol Biochem* 41, 811-818.
- Rebelato, E., Abdulkader, F., Curi, R., and Carpinelli, A.R. (2011). Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. *PLoS One* 6, e24507.

- Reinbothe, T.M., Ivarsson, R., Li, D.Q., Niazi, O., Jing, X., Zhang, E., Stenson, L., Bryborn, U., and Renstrom, E. (2009). Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol Endocrinol* 23, 893-900.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14, 2819-2830.
- Reshef, L., Hanson, R.W., and Ballard, F.J. (1969). Glyceride-glycerol synthesis from pyruvate. Adaptive changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in adipose tissue and liver. *J Biol Chem* 244, 1994-2001.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M., and Hanson, R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *The Journal of biological chemistry* 278, 30413-30416.
- Reusch, J.E. (2002). Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. *The American journal of cardiology* 90, 19G-26G.
- Reusch, J.E. (2003). Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *The Journal of clinical investigation* 112, 986-988.
- Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C., et al. (2002). Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108, 121-133.
- Ricci, C., Jong, C.J., and Schaffer, S.W. (2008). Proapoptotic and antiapoptotic effects of hyperglycemia: role of insulin signaling. *Can J Physiol Pharmacol* 86, 166-172.
- Richardson, S.J., Willcox, A., Bone, A.J., Foulis, A.K., and Morgan, N.G. (2009). Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia* 52, 1686-1688.
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of biological chemistry* 279, 42351-42354.
- Robertson, R.P. (2006). Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Current opinion in pharmacology* 6, 615-619.
- Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., and Poitout, V. (2004). Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1, S119-124.
- Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Tanaka, Y., and Takahashi, H. (2003). Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52, 581-587.
- Robertson, R.P., Zhang, H.J., Pyzdrowski, K.L., and Walseth, T.F. (1992). Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *The Journal of clinical investigation* 90, 320-325.

- Robinson, J.L., Hall, J.R., Charman, M., Ewart, K.V., and Driedzic, W.R. (2011). Molecular analysis, tissue profiles, and seasonal patterns of cytosolic and mitochondrial GPDH in freeze-resistant rainbow smelt (*Osmerus mordax*). *Physiol Biochem Zool* 84, 363-376.
- Roduit, R., Masiello, P., Wang, S.P., Li, H., Mitchell, G.A., and Prentki, M. (2001). A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Diabetes* 50, 1970-1975.
- Roduit, R., Nolan, C., Alarcon, C., Moore, P., Barbeau, A., Delghingaro-Augusto, V., Przybykowski, E., Morin, J., Masse, F., Massie, B., et al. (2004). A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 53, 1007-1019.
- Romero Mdel, M., Sabater, D., Fernandez-Lopez, J.A., Remesar, X., and Alemany, M. (2015). Glycerol Production from Glucose and Fructose by 3T3-L1 Cells: A Mechanism of Adipocyte Defense from Excess Substrate. *PLoS One* 10, e0139502.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 519-529.
- Rose, Z.B. (1981). Phosphoglycolate phosphatase from human red blood cells. *Arch Biochem Biophys* 208, 602-609.
- Rossetti, L. (2000). Perspective: Hexosamines and nutrient sensing. *Endocrinology* 141, 1922-1925.
- Rothe, G., and Valet, G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47, 440-448.
- Ruderman, N., and Prentki, M. (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nature reviews. Drug discovery* 3, 340-351.
- Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Hemi, R., Kanety, H., and Bashan, N. (1998). Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 47, 1562-1569.
- Rush, G.F., Gorski, J.R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P., and Hewitt, W.R. (1985). Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 78, 473-483.
- Rutter, G.A. (2001). Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Molecular aspects of medicine* 22, 247-284.
- Saddik, M., and Lopaschuk, G.D. (1991). Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *The Journal of biological chemistry* 266, 8162-8170.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.

- Sandberg, M.B., Fridriksson, J., Madsen, L., Rishi, V., Vinson, C., Holmsen, H., Berge, R.K., and Mandrup, S. (2005). Glucose-induced lipogenesis in pancreatic beta-cells is dependent on SREBP-1. *Mol Cell Endocrinol* 240, 94-106.
- Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H.C., Martin, G.R., and German, M.S. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11, 1662-1673.
- Sarre, A., Gabrielli, J., Vial, G., Leverve, X.M., and Assimacopoulos-Jeannet, F. (2012). Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells. *Free Radic Biol Med* 52, 142-150.
- Savage, D.B., Choi, C.S., Samuel, V.T., Liu, Z.X., Zhang, D., Wang, A., Zhang, X.M., Cline, G.W., Yu, X.X., Geisler, J.G., et al. (2006). Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 116, 817-824.
- Scherthaner, G.H., and Scherthaner, G. (2005). Insulin resistance and inflammation in the early phase of type 2 diabetes: potential for therapeutic intervention. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 240, 30-40.
- Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C., and Kaufman, R.J. (2005). Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nature medicine* 11, 757-764.
- Schmidt, A.M., Hori, O., Brett, J., Yan, S.D., Wautier, J.L., and Stern, D. (1994). Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14, 1521-1528.
- Schmitz-Peiffer, C., Laybutt, D.R., Burchfield, J.G., Gurisik, E., Narasimhan, S., Mitchell, C.J., Pedersen, D.J., Braun, U., Cooney, G.J., Leitges, M., et al. (2007). Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab* 6, 320-328.
- Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., and Prentki, M. (1997). Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* 272, 18572-18579.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831-2838.
- Segall, L., Lameloise, N., Assimacopoulos-Jeannet, F., Roche, E., Corkey, P., Thumelin, S., Corkey, B.E., and Prentki, M. (1999). Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *The American journal of physiology* 277, E521-528.

- Seino, S., and Shibasaki, T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 85, 1303-1342.
- Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L.J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M.J., Wollheim, C.B., et al. (1994). Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* 269, 4895-4902.
- Sener, A., and Malaisse, W.J. (1980). L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288, 187-189.
- Seo, H.Y., Kim, Y.D., Lee, K.M., Min, A.K., Kim, M.K., Kim, H.S., Won, K.C., Park, J.Y., Lee, K.U., Choi, H.S., et al. (2008). Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Endocrinology* 149, 3832-3841.
- Seyer, P., Vallois, D., Poitry-Yamate, C., Schutz, F., Metref, S., Tarussio, D., Maechler, P., Staels, B., Lanz, B., Grueter, R., et al. (2013). Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence. *J Clin Invest* 123, 1662-1676.
- Sharma, A., Olson, L.K., Robertson, R.P., and Stein, R. (1995). The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Molecular endocrinology* 9, 1127-1134.
- Sharma, A.M., and Staels, B. (2007). Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 386-395.
- Sharma, S., Mells, J.E., Fu, P.P., Saxena, N.K., and Anania, F.A. (2011). GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy. *PLoS One* 6, e25269.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., and Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice* 87, 4-14.
- She, P., Shiota, M., Shelton, K.D., Chalkley, R., Postic, C., and Magnuson, M.A. (2000). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol Cell Biol* 20, 6508-6517.
- Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116, 3015-3025.
- Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116, 1793-1801.

- Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 106, 171-176.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* 18, 175-189.
- Simmons, R.A., Suponitsky-Kroyter, I., and Selak, M.A. (2005). Progressive accumulation of mitochondrial DNA mutations and decline in mitochondrial function lead to beta-cell failure. *The Journal of biological chemistry* 280, 28785-28791.
- Simpson, N.E., Khokhlova, N., Oca-Cossio, J.A., and Constantinidis, I. (2006). Insights into the role of anaplerosis in insulin secretion: A ^{13}C NMR study. *Diabetologia* 49, 1338-1348.
- Skraly, F.A., and Cameron, D.C. (1998). Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific for D-alpha-glycerophosphate. *Archives of biochemistry and biophysics* 349, 27-35.
- Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., et al. (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881-885.
- Sluse, F.E., Jarmuszkiewicz, W., Navet, R., Douette, P., Mathy, G., and Sluse-Goffart, C.M. (2006). Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta* 1757, 480-485.
- Smith, D., and DeFronzo, R.A. (1982). Insulin resistance in uremia mediated by postbinding defects. *Kidney international* 22, 54-62.
- Spegel, P., Malmgren, S., Sharoyko, V.V., Newsholme, P., Koeck, T., and Mulder, H. (2011). Metabolomic analyses reveal profound differences in glycolytic and tricarboxylic acid cycle metabolism in glucose-responsive and -unresponsive clonal beta-cell lines. *Biochem J* 435, 277-284.
- Stanley, S., Pinto, S., Segal, J., Perez, C.A., Viale, A., DeFalco, J., Cai, X., Heisler, L.K., and Friedman, J.M. (2010). Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7024-7029.
- Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A., and Haring, H.U. (2008). Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Archives of internal medicine* 168, 1609-1616.
- Stefan, N., Stumvoll, M., Bogardus, C., and Tataranni, P.A. (2003). Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 284, E1156-1161.
- Stein, D.T., Esser, V., Stevenson, B.E., Lane, K.E., Whiteside, J.H., Daniels, M.B., Chen, S., and McGarry, J.D. (1996). Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 97, 2728-2735.

- Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Febbraio, M.A., and Kemp, B.E. (2006). AMP-activated protein kinase--the fat controller of the energy railroad. *Can J Physiol Pharmacol* *84*, 655-665.
- Stoffers, D.A., Ferrer, J., Clarke, W.L., and Habener, J.F. (1997). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature genetics* *17*, 138-139.
- Straub, S.G., and Sharp, G.W. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* *18*, 451-463.
- Succurro, E., Marini, M.A., Frontoni, S., Hribal, M.L., Andreozzi, F., Lauro, R., Perticone, F., and Sesti, G. (2008). Insulin secretion in metabolically obese, but normal weight, and in metabolically healthy but obese individuals. *Obesity* *16*, 1881-1886.
- Suckale, J., and Solimena, M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci* *13*, 7156-7171.
- Tajiri, Y., Moller, C., and Grill, V. (1997). Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function. *Endocrinology* *138*, 273-280.
- Takahashi, N., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Ellis-Davies, G.C., Miyashita, Y., and Kasai, H. (1999). Post-priming actions of ATP on Ca²⁺-dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 760-765.
- Takeuchi, K., and Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* *296*, E1195-1209.
- Tang-Christensen, M., Larsen, P.J., Thulesen, J., Nielsen, J.R., and Vrang, N. (2001). [Glucagon-like peptide 2, a neurotransmitter with a newly discovered role in the regulation of food ingestion]. *Ugeskr Laeger* *163*, 287-291.
- Tang, T., Abbott, M.J., Ahmadian, M., Lopes, A.B., Wang, Y., and Sul, H.S. (2013). Desnutrin/ATGL activates PPARdelta to promote mitochondrial function for insulin secretion in islet beta cells. *Cell Metab* *18*, 883-895.
- Targonsky, E.D., Dai, F., Koshkin, V., Karaman, G.T., Gyulkhandanyan, A.V., Zhang, Y., Chan, C.B., and Wheeler, M.B. (2006). alpha-lipoic acid regulates AMP-activated protein kinase and inhibits insulin secretion from beta cells. *Diabetologia* *49*, 1587-1598.
- Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., Oshikawa, T., Yokoyama, H., Shimamura, K., Tominaga, S., Hiroi, S., Irie, R., Okada, Y., et al. (2012). A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* *142*, 152-164 e110.

- Teresa Pellicer, M., Felisa Nunez, M., Aguilar, J., Badia, J., and Baldoma, L. (2003). Role of 2-phosphoglycolate phosphatase of *Escherichia coli* in metabolism of the 2-phosphoglycolate formed in DNA repair. *J Bacteriol* *185*, 5815-5821.
- Tiano, J.P., Delghingaro-Augusto, V., Le May, C., Liu, S., Kaw, M.K., Khuder, S.S., Latour, M.G., Bhatt, S.A., Korach, K.S., Najjar, S.M., et al. (2011). Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents beta cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *J Clin Invest* *121*, 3331-3342.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., and Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* *46*, 1733-1742.
- Tietge, U.J., Selberg, O., Kreter, A., Bahr, M.J., Pirlich, M., Burchert, W., Muller, M.J., Manns, M.P., and Boker, K.H. (2004). Alterations in glucose metabolism associated with liver cirrhosis persist in the clinically stable long-term course after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* *10*, 1030-1040.
- Tiikkainen, M., Hakkinen, A.M., Korshennikova, E., Nyman, T., Makimattila, S., and Yki-Jarvinen, H. (2004). Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* *53*, 2169-2176.
- Timpson, N.J., Lindgren, C.M., Weedon, M.N., Randall, J., Ouwehand, W.H., Strachan, D.P., Rayner, N.W., Walker, M., Hitman, G.A., Doney, A.S., et al. (2009). Adiposity-related heterogeneity in patterns of type 2 diabetes susceptibility observed in genome-wide association data. *Diabetes* *58*, 505-510.
- Topham, M.K. (2006). Signaling roles of diacylglycerol kinases. *Journal of cellular biochemistry* *97*, 474-484.
- Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H., and Marette, A. (2007). Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annual review of nutrition* *27*, 293-310.
- Tsang, C.K., Qi, H., Liu, L.F., and Zheng, X.F. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug discovery today* *12*, 112-124.
- Tsao, T.S., Stenbit, A.E., Factor, S.M., Chen, W., Rossetti, L., and Charron, M.J. (1999). Prevention of insulin resistance and diabetes in mice heterozygous for GLUT4 ablation by transgenic complementation of GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes* *48*, 775-782.
- Unger, R.H. (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* *44*, 863-870.
- Unger, R.H., and Grundy, S. (1985). Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* *28*, 119-121.

- Unger, R.H., and Zhou, Y.T. (2001). Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 50 Suppl 1, S118-121.
- Utzschneider, K.M., and Kahn, S.E. (2006). Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91, 4753-4761.
- Vancura, A., and Haldar, D. (1994). Purification and characterization of glycerophosphate acyltransferase from rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 269, 27209-27215.
- Vaughan, M. (1962). The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *The Journal of biological chemistry* 237, 3354-3358.
- Vazquez-Vela, M.E., Torres, N., and Tovar, A.R. (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of medical research* 39, 715-728.
- Veerababu, G., Tang, J., Hoffman, R.T., Daniels, M.C., Hebert, L.F., Jr., Crook, E.D., Cooksey, R.C., and McClain, D.A. (2000). Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes* 49, 2070-2078.
- Vella, A., Camilleri, M., and Rizza, R.A. (2004). The gastrointestinal tract and glucose tolerance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 7, 479-484.
- Vetterli, L., Carobbio, S., Pournourmohammadi, S., Martin-Del-Rio, R., Skytt, D.M., Waagepetersen, H.S., Tamarit-Rodriguez, J., and Maechler, P. (2012). Delineation of glutamate pathways and secretory responses in pancreatic islets with beta-cell-specific abrogation of the glutamate dehydrogenase. *Mol Biol Cell* 23, 3851-3862.
- Vilsboll, T., Krarup, T., Madsbad, S., and Holst, J.J. (2003). Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regulatory peptides* 114, 115-121.
- Wahren, J., Sato, Y., Ostman, J., Hagenfeldt, L., and Felig, P. (1984). Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *J Clin Invest* 73, 1367-1376.
- Walker, A.K., Yang, F., Jiang, K., Ji, J.Y., Watts, J.L., Purushotham, A., Boss, O., Hirsch, M.L., Ribich, S., Smith, J.J., et al. (2010). Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev* 24, 1403-1417.
- Wallace, T.M., Levy, J.C., and Matthews, D.R. (2004). Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes care* 27, 1487-1495.
- Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112.

- Wang, P.Y., Caspi, L., Lam, C.K., Chari, M., Li, X., Light, P.E., Gutierrez-Juarez, R., Ang, M., Schwartz, G.J., and Lam, T.K. (2008). Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature* 452, 1012-1016.
- Wang, Y., Li, G., Goode, J., Paz, J.C., Ouyang, K., Srean, R., Fischer, W.H., Chen, J., Tabas, I., and Montminy, M. (2012). Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes. *Nature* 485, 128-132.
- Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S., and Kahn, C.R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Annals of internal medicine* 113, 909-915.
- Wasserman, D.H., Spalding, J.A., Lacy, D.B., Colburn, C.A., Goldstein, R.E., and Cherrington, A.D. (1989). Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am J Physiol* 257, E108-117.
- Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S., and Sharma, A. (2001). Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S154-159.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112, 1796-1808.
- Weiss, R., and Kaufman, F.R. (2008). Metabolic complications of childhood obesity: identifying and mitigating the risk. *Diabetes care* 31 Suppl 2, S310-316.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation* 115, 1111-1119.
- Welsh, N., Margulis, B., Borg, L.A., Wiklund, H.J., Saldeen, J., Flodstrom, M., Mello, M.A., Andersson, A., Pipeleers, D.G., Hellerstrom, C., et al. (1995). Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Molecular medicine* 1, 806-820.
- Wendel, A.A., Cooper, D.E., Ilkayeva, O.R., Muoio, D.M., and Coleman, R.A. (2013). Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)-1, but not GPAT4, incorporates newly synthesized fatty acids into triacylglycerol and diminishes fatty acid oxidation. *The Journal of biological chemistry* 288, 27299-27306.
- Wendel, A.A., Lewin, T.M., and Coleman, R.A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 501-506.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D.M., and Pratley, R.E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 104, 787-794.

- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E413-422.
- Winzell, M.S., Svensson, H., Enerback, S., Ravnskjaer, K., Mandrup, S., Esser, V., Arner, P., Alves-Guerra, M.C., Miroux, B., Sundler, F., et al. (2003). Pancreatic beta-cell lipotoxicity induced by overexpression of hormone-sensitive lipase. *Diabetes* 52, 2057-2065.
- Wollheim, C.B., and Maechler, P. (2002). Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* 51 Suppl 1, S37-42.
- Wong, N., Blair, A.R., Morahan, G., and Andrikopoulos, S. (2010). The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology* 151, 96-102.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Jr., and Schwartz, M.W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 1378-1383.
- Wouters, K., van Gorp, P.J., Bieghs, V., Gijbels, M.J., Duimel, H., Lutjohann, D., Kerksiek, A., van Kruchten, R., Maeda, N., Staels, B., et al. (2008). Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48, 474-486.
- Wu, Z., Jiao, P., Huang, X., Feng, B., Feng, Y., Yang, S., Hwang, P., Du, J., Nie, Y., Xiao, G., et al. (2010). MAPK phosphatase-3 promotes hepatic gluconeogenesis through dephosphorylation of forkhead box O1 in mice. *J Clin Invest* 120, 3901-3911.
- Xiang, X., Saha, A.K., Wen, R., Ruderman, N.B., and Luo, Z. (2004). AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochemical and biophysical research communications* 321, 161-167.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 112, 1821-1830.
- Xu, J., Han, J., Long, Y.S., Lock, J., Weir, G.C., Epstein, P.N., and Liu, Y.Q. (2008). Malic enzyme is present in mouse islets and modulates insulin secretion. *Diabetologia* 51, 2281-2289.
- Xue, J.H., Yuan, Z., Wu, Y., Liu, Y., Zhao, Y., Zhang, W.P., Tian, Y.L., Liu, W.M., Liu, Y., and Kishimoto, C. (2010). High glucose promotes intracellular lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by impairing cholesterol influx and efflux balance. *Cardiovasc Res* 86, 141-150.
- Yabe, D., and Seino, Y. (2011). Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and beta cell preservation. *Prog Biophys Mol Biol* 107, 248-256.

- Yajima, H., Komatsu, M., Schermerhorn, T., Aizawa, T., Kaneko, T., Nagai, M., Sharp, G.W., and Hashizume, K. (1999). cAMP enhances insulin secretion by an action on the ATP-sensitive K⁺ channel-independent pathway of glucose signaling in rat pancreatic islets. *Diabetes* 48, 1006-1012.
- Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R.D., Lathrop, G.M., Boriraj, V.V., et al. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384, 455-458.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X.X., Pandey, S.K., Bhanot, S., Monia, B.P., Li, Y.X., and Diehl, A.M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45, 1366-1374.
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., and Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9116-9121.
- Yang, L., Kombu, R.S., Kasumov, T., Zhu, S.H., Cendrowski, A.V., David, F., Anderson, V.E., Kelleher, J.K., and Brunengraber, H. (2008). Metabolomic and mass isotopomer analysis of liver gluconeogenesis and citric acid cycle. I. Interrelation between gluconeogenesis and cataplerosis; formation of methoxamates from aminooxyacetate and ketoacids. *J Biol Chem* 283, 21978-21987.
- Yasuda, T., Shibasaki, T., Minami, K., Takahashi, H., Mizoguchi, A., Uriu, Y., Numata, T., Mori, Y., Miyazaki, J., Miki, T., et al. (2010). Rim2alpha determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab* 12, 117-129.
- Yokoyama, S. (2000). Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta* 1529, 231-244.
- Younossi, Z.M., Diehl, A.M., and Ong, J.P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. *Hepatology* 35, 746-752.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of biological chemistry* 277, 50230-50236.
- Yu, X., McCorkle, S., Wang, M., Lee, Y., Li, J., Saha, A.K., Unger, R.H., and Ruderman, N.B. (2004). Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* 47, 2012-2021.
- Yu, Y.H., and Ginsberg, H.N. (2004). The role of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) in energy metabolism. *Annals of medicine* 36, 252-261.
- Zawalich, W.S., and Rasmussen, H. (1990). Control of insulin secretion: a model involving Ca²⁺, cAMP and diacylglycerol. *Mol Cell Endocrinol* 70, 119-137.

- Zechner, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Lass, A., and Zimmermann, R. (2005). Lipolysis: pathway under construction. *Current opinion in lipidology* *16*, 333-340.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., and Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* *15*, 279-291.
- Zhang, T., Wang, S., Lin, Y., Xu, W., Ye, D., Xiong, Y., Zhao, S., and Guan, K.L. (2012). Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1. *Cell Metab* *15*, 75-87.
- Zhao, C., Wilson, M.C., Schuit, F., Halestrap, A.P., and Rutter, G.A. (2001). Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes* *50*, 361-366.
- Zhao, L., Guo, M., Matsuoka, T.A., Hagman, D.K., Parazzoli, S.D., Poitout, V., and Stein, R. (2005). The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem* *280*, 11887-11894.
- Zhao, S., Mugabo, Y., Ballentine, G., Attane, C., Iglesias, J., Poursharifi, P., Zhang, D., Nguyen, T.A., Erb, H., Prentki, R., et al. (2016). alpha/beta-Hydrolase Domain 6 Deletion Induces Adipose Browning and Prevents Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Rep* *14*, 2872-2888.
- Zhao, S., Mugabo, Y., Iglesias, J., Xie, L., Delghingaro-Augusto, V., Lussier, R., Peyot, M.L., Joly, E., Taib, B., Davis, M.A., et al. (2014). alpha/beta-Hydrolase domain-6-accessible monoacylglycerol controls glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab* *19*, 993-1007.
- Zhao, S., Poursharifi, P., Mugabo, Y., Levens, E.J., Vivot, K., Attane, C., Iglesias, J., Peyot, M.L., Joly, E., Madiraju, S.R., et al. (2015). alpha/beta-Hydrolase domain-6 and saturated long chain monoacylglycerol regulate insulin secretion promoted by both fuel and non-fuel stimuli. *Mol Metab* *4*, 940-950.
- Zhou, Y.P., Ling, Z.C., and Grill, V.E. (1996). Inhibitory effects of fatty acids on glucose-regulated B-cell function: association with increased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxidation on glucose metabolism. *Metabolism* *45*, 981-986.
- Zhou, Y.T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., and Unger, R.H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 1784-1789.
- Zimmet, P., Alberti, K.G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* *414*, 782-787.